



Universidad Autónoma de Tlaxcala

**Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
Posgrado en Ciencias Biológicas**

Efectos del hipotiroidismo y yodo en la expresión de
TNF- α e IL-6 en ovarios de conejas adultas

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta
Q.C. Monserrat Bautista Ortiz

Directora de tesis
Dra. Estela Cuevas Romero

Tutoras
Dra. Leticia Nicolás Toledo
Dra. Julia de Guadalupe Rodríguez Castelán

Tlaxcala, Tlax.

Septiembre, 2024



Universidad Autónoma de Tlaxcala

**Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
Posgrado en Ciencias Biológicas**

Efectos del hipotiroidismo y yodo en la expresión de
TNF- α e IL-6 en ovarios de conejas adultas

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta
Q.C. Monserrat Bautista Ortiz

Directora de tesis
Dra. Estela Cuevas Romero

Tutoras
Dra. Leticia Nicolás Toledo
Dra. Julia de Guadalupe Rodríguez Castelán

Tlaxcala, Tlax.

Septiembre, 2024

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Endocrinología del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala y bajo la dirección de la Dra. Estela Cuevas Romero. El financiamiento fue otorgado por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCyT-Ciencia de Frontera 749821).



CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
Coordinación de la División de Ciencias Biológicas
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado

COMITÉ ACADÉMICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sirva este medio para describir el proceso de revisión de la tesis realizada por la estudiante **Monserrat Bautista Ortiz** titulada “**Efectos del hipotiroidismo y yodo en la expresión de TNF- α e IL-6 en ovarios de conejas adultas**” para optar por su grado de **Maestra en Ciencias Biológicas**.

El documento de la tesis de **Monserrat Bautista Ortiz** fue revisado por mi como directora de tesis y por su comité antes de presentar cada examen tutorial. De manera que el documento, llevó un proceso de revisión por varios profesores expertos en el tema. Al finalizar los créditos del programa de Maestría, se eligieron profesores para formar parte del jurado del examen de grado que también llevó a cabo la revisión del documento de tesis.

En el mes de septiembre, el documento final de la tesis fue procesado con el programa del Turnitin marcando poco texto con similitudes (2%). Los textos detectados corresponden con palabras comunes que no implican un copiado de otros documentos. Por lo anterior, confirmo que **la estudiante no incurrió en ninguna práctica no deseable** en la escritura de la tesis.

Sin más por el momento, reciban atentos saludos.

CORDIALMENTE

Tlaxcala, Tlax., a 22 de septiembre de 2024

Dra. Estela Cuevas Romero

Directora de tesis



Sistema Institucional de Autogestión de la Calidad Certificado bajo la Norma:
ISO 9001:2015-NMX-CC-9001-IMNC-2015



**COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E**

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Montserrat Bautista Ortiz** realiza para la obtención del grado de **Maestra en Ciencias Biológicas**, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es “Efecto del hipotiroidismo y yodo en la expresión de **TNF- α** e **IL-6** en ovarios de conejas adultas”.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
TLAXCALA, TLAX., A 16 DE AGOSTO DE 2024

DRA. LETICIA NICOLÁS TOLEDO

DRA. ESTELA CUEVAS ROMERO

DR. RENÉ ZEMPOALTECA RAMÍREZ

DRA. MARIBEL MÉNDEZ TEPEPA

DRA. ELIZABETH BAUTISTA RODRÍGUEZ

Agradecimientos

Agradezco a título personal a mis padres, Silvia Ortiz Esparza y José Antonio Bautista Cuellar, quienes con cariño y sabiduría me han guiado en la vida. Les agradezco por su paciencia, por hacer el espacio de escucharme y comprenderme, por darme la motivación y resiliencia día a día para cumplir las metas y proyectos que he culminado.

A mis hermanos Carolina y José Antonio, agradezco por acompañarme siempre en mis decisiones, complementándome en mi formación humana, por transmitirme sus conocimientos y experiencias y por contar con su apoyo incondicional. También agradezco a mis cuñis Esthercita y Ale por su cercanía y apoyo.

A Darío, por compartir más que los días, por su amor, tiempo, paciencia y comprensión.

A mis abuelos, quienes en su momento me brindaron su amor, sabiduría y compañía en mi niñez.

A mis amigos, la Dra. Rubi, Mtro. Carlos, Mtra. Anita, QC. Genesis, Ing. Tonantzi, Mtra, Emma y a mis compañeros de laboratorio quienes hicieron más ameno y divertido el ambiente de convivencia diaria en el laboratorio.

Al posgrado en ciencias biológicas del Centro Tlaxcala Biología de la Conducta, por permitirme desarrollar mi proyecto de investigación en sus instalaciones, así como el recibimiento en su cálida comunidad.

A la Universidad Autónoma de Tlaxcala por brindarme las herramientas, el espacio, la gestión de los recursos humanos y los medios para seguir desarrollándome en mi carrera científica.

A la Dra. Estela Cuevas Romero, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo por 3 años, compartiendo su sabiduría y guiarme en el camino del mundo científico, despertando en mí la chispa de la investigación desde las primeras clases de biología celular en mi carrera.

El agradecimiento se hace extenso a los miembros del comité tutorial, a la Dra. Leticia Nicolás Toledo y a la Dra. Julia de Guadalupe Rodríguez Castelán, por sus valiosos aportes, consejos, acompañamiento en los congresos y contribuciones a dicho proyecto.

Dedicatoria

A mi familia, a la pequeña Monse y a mi pequeña sobrina Zoe.

A la vida

Resumen

El hipotiroidismo reduce la fertilidad, disminuye el diámetro de los folículos en ovarios de conejas, estimula la infiltración de células inmunes en páncreas, hígado, estroma ovárico y tejido peri-ovárico, disminuye los triglicéridos, la expresión de Aromatasa, FSHR, PPAR, PLIN.A e incrementa las reservas de glucógeno, colesterol y la expresión de GPER1 en ovarios de conejas. Así mismo, el hipotiroidismo se ha asociado con patologías tales como síndrome de ovario poliquístico, endometriosis, resistencia a la insulina, obesidad e insuficiencia ovárica prematura; estas patologías han sido descritas como proinflamatorias, con incremento de estrés oxidativo y con alteraciones hormonales.

El yodo es el principal compuesto en la síntesis de hormonas tiroideas, en forma de yodo molecular (I_2) ha sido reportado como antiproliferativo, antiangiogénico, proapoptótico, anticancerígeno, antioxidante en dosis adecuadas, mientras que en exceso funge como un oxidante y disruptor endocrino. La irrigación de yodo disminuye el tamaño de quistes ováricos en ratas, en dosis bajas incrementa la expresión del antioxidante SOD en páncreas, disminuye efectos adversos al tratamiento con estreptozotocina en ratones, disminuye el tamaño de carcinomas mamarios en mujeres y funciona como inmunomodulador.

El objetivo de esta investigación es evaluar los efectos del hipotiroidismo y el yodo en la expresión de $TNF\alpha$ e IL-6. Se emplearon 24 conejas (*Oryctolagus cuniculus*), divididas en 4 grupos: control n=6, hipotiroideo (metimazol) n=6, yodo n=6 y MMI (Metimazol + yodo) n=6. Al primer grupo se les dio de beber agua, al segundo se le dio agua con metimazol (10 mg/Kg), al tercero se les dio a beber agua con yodo ($I^- + I_2$, 0.2 mg/kg) y al cuarto se les dio a beber metimazol más yodo por 30 días. A los animales se les realizó la eutanasia, los ovarios se obtuvieron y procesaron para inmunohistoquímica de $TNF-\alpha$ e IL-6.

Nuestros resultados sugieren que el hipotiroidismo incrementa la expresión de $TNF-\alpha$ en los folículos primordiales, secundarios maduros, terciarios, corteza y estroma respecto al control. mientras que el grupo metimazol más yodo incrementó la expresión en folículos de mayor maduración (secundarios maduros y terciarios), estroma, hilio y folículos en atresia infiltrativa. Por otro lado, la expresión de IL-6 se vio disminuida en el grupo hipotiroideo respecto al control, en folículos secundarios inmaduros, secundarios maduros e hilio, así mismo el grupo metimazol más yodo restableció la expresión en folículos secundarios inmaduros, mientras que en corteza, folículos primordiales, primarios y folículos en atresia obliterativa no hubo diferencias en la expresión. Sin embargo, en los grupos tratados con yodo, se incrementó la expresión de IL-6 en folículos terciarios y atresia infiltrativa. Los resultados sugieren que el tratamiento de yodo aumenta la infiltración de células inmunes modulando la expresión de citocinas, IL-6 como antiinflamatoria y $TNF\alpha$ como proinflamatorio, siendo potenciadas por aumento de metabolismo y estrés oxidativo en estadios de mayor maduración.

1. Introducción	12
1.1 Generalidades del ovario	12
1.1.1 Metabolismo y estrés oxidativo en la maduración folicular	17
1.1.2 Inflamación y foliculogénesis	19
1.1.3 Atresia folicular	24
1.2 Patologías y alteraciones ováricas	25
1.3 Hipotiroidismo, metabolismo e inflamación	27
1.4 Generalidades de yodo	28
2 Antecedentes	32
2.1 Hipotiroidismo y función ovárica	32
2.2 Yodo y ovario	34
3. Justificación	36
4. Hipótesis	37
5. Objetivo General	37
5.1 Objetivos específicos	37
6. Metodología	38
6.1 Animales y tratamiento	38
6.2 Inmunohistoquímica	40
6.3 Análisis histológico	38
6.4 Análisis estadístico	41
7. Resultados	42
7.1 Yodo y maduración folicular	42
7.2 Yodo y atresia folicular	¡Error! Marcador no definido.
8. Discusión	56
9. Conclusiones	60
10. Perspectivas de investigación	62
11. Referencias	63

Abreviaciones

BMP-15: proteína morfogenética ósea 15

ERO: Especies reactivas de oxígeno

FSH: Hormona folículo estimulante

GDF-9: factor de diferenciación de crecimiento 9

GH: hormona de crecimiento

GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas

IGF: factor de crecimiento similar a la insulina

IL-1 β : interleucina-1 β

IL-6: Interleucina 6

IOP: Insuficiencia ovárica prematura

LH: Hormona luteinizante

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta

TNF- α : factor de necrosis tumoral α

TSH: Hormona estimulante de la tiroides

T3: Triyodotironina

T4: Tetrayodotironina

VEGF: factor de crecimiento de endotelio vascular

1. Introducción

1.1 Generalidades del ovario

El aparato reproductor de la coneja está conformado por dos ovarios, dos oviductos, dos cuernos uterinos, un cuello uterino y una vagina. En la coneja, los ovarios son dos estructuras arriñonadas que miden de 1 a 1.5 cm de largo, color blanco-amarillento, envueltos en un pliegue del peritoneo a través del cual se pueden observar bultos que corresponden a los folículos en estadios de mayor maduración. Alrededor de 16 a 17 días, y bajo estímulos hormonales, inicia el ciclo ovárico de la coneja con la finalidad de lograr la maduración de los folículos y la producción de estrógenos. En esta maduración folicular participan las hormonas gonadotropinas y esteroideas (Sirotkin et al., 2014). La regulación hipotalámica inicia con la activación del receptor de kisspeptina, a través del estradiol en el área preóptica, área hipotalámica anterior, el hipotálamo basal medial y en la eminencia media del hipotálamo, que fosforila la proteína óxido nítrico sintetasa, provocando una liberación pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), los pulsos de alta frecuencia estimulan la síntesis de la hormona luteinizante (LH) y los pulsos de baja frecuencia estimula la síntesis de la hormona folículo estimulante (FSH). Estas gonadotropinas son producidas en la glándula hipófisis actuando en las gónadas para la producción de hormonas esteroideas y el desarrollo gonadal, estimulando así la ovulación (Chang et al., 2022; Hu et al., 2022).

El ovario se encarga de la preservación y maduración de las células germinales femeninas con el objetivo del éxito reproductivo (Kiran, 2021). Está conformado por el parénquima ovárico compuesto por las unidades funcionales (óvulos) y el estroma ovárico, el cual está diversamente compuesto por células inmunes, vasos sanguíneos, vasos linfáticos, epitelio de la superficie, túnica albugínea, células hiliares que producen andrógenos, células madre y células estromales tipo fibroblasto. Dentro de las funciones del estroma ovárico se encuentran la remodelación del tejido, señalización, soporte y síntesis de hormonas (Kinnear et al., 2020) (Figura 1). La innervación nerviosa en el ovario ocurre a través del ganglio celiaco que se distribuye a través del plexo ovárico en los vasos sanguíneos y el nervio ovárico superior se proyecta a los folículos (Baljet y Drukker, 1979). En cerdas, la denervación ovárica aumenta el

número de folículos pequeños (<3 mm) y disminuye el número de folículos grandes (>7 mm). Dicho hallazgo se asocia con la disminución de progesterona, estrona, estradiol, LH y testosterona, evidenciando la participación del sistema nervioso en la maduración folicular. El nervio ovárico superior también regula la esteroidogénesis (Jana et al., 2007).

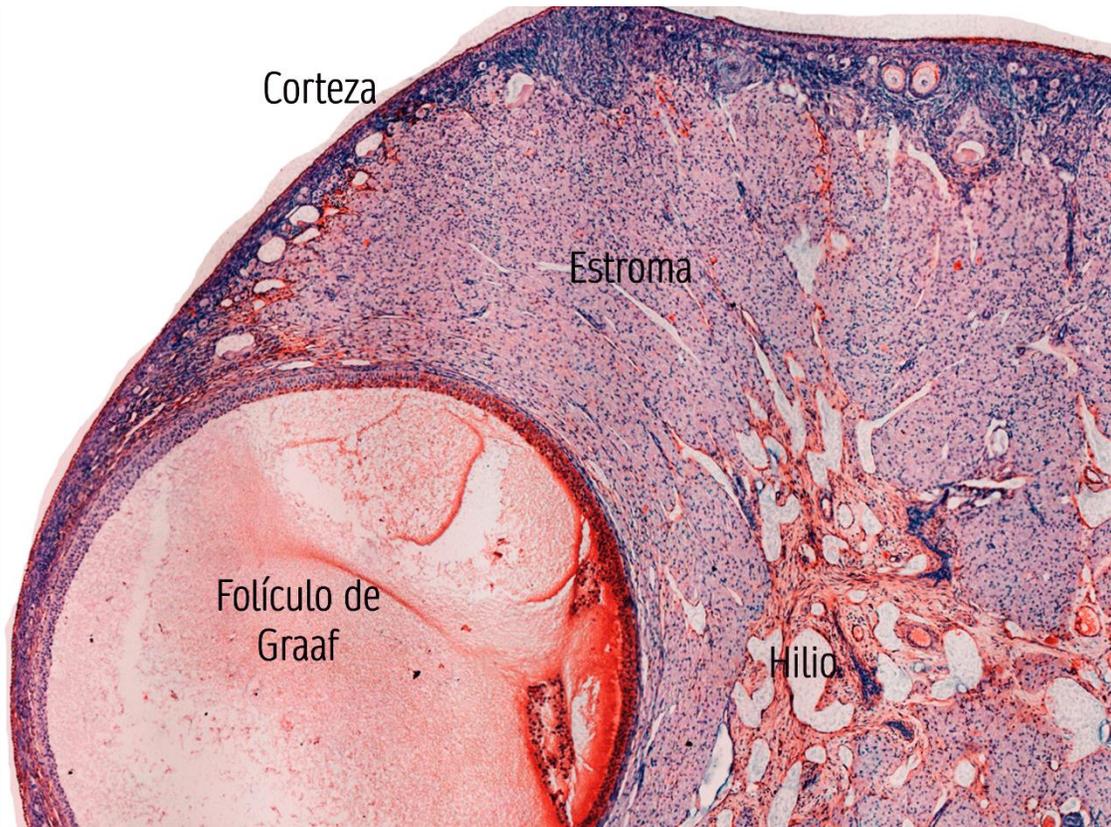


Figura 1. Ovario de coneja *Oryctolagus cuniculus*, corte transversal, inmunohistoquímica de IL-6, contratiación con Hematoxilina de Mayer. Fuente propia.

En la mujer, los ovarios contienen una cantidad limitada de ovocitos, nacen con un aproximado de 600 000 folículos quiescentes los cuales disminuyen a lo largo de la vida a través de diversos procesos como atresia, atrición y errores meióticos. En la pubertad, los folículos disminuyen a 300,000, tal disminución continúa con la edad hasta agotar la reserva ovárica presentando la menopausia (Park et al., 2022). El sistema neuroinmunoendocrino permite la maduración y diferenciación de los ovocitos para lograr el éxito reproductivo (Clarke 2018). El folículo está compuesto por un ovocito con núcleo acéntrico rodeado de células de la granulosa

que, a su vez, están rodeadas de una membrana folicular o células de la teca (Zhang y Zhang, 2020). Los folículos se clasifican de acuerdo con el número de células de la granulosa como folículos primordiales, primarios, secundarios, terciarios y de Graff (Gershon y Dekel, 2020). La hormona de crecimiento (GH) actúa en sinergia con el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), promoviendo la diferenciación de células de la granulosa, siendo reguladores intraováricos, esteroidogénicos, de proliferación celular y desarrollo folicular (Sato et al., 2018) (Figura 2).

Folículos primordiales. La cantidad de folículos ováricos se establecen en los primeros años de vida. Estos ovocitos están meióticamente detenidos en un 90% aproximadamente, permanecen de manera quiescente para asegurar la vida reproductiva (Kehoe et al., 2021). Están rodeados por una capa de células foliculares planas, las cuales participan en la activación del desarrollo de los ovocitos estimulando la oxigenación, nutrición, energía y factores de crecimiento (Saccon et al., 2020). Entre las células foliculares y el ovocito se encuentra la zona pelúcida y la matriz extracelular glicoproteíca. El diámetro de los ovocitos primordiales en conejas es de 30-44 μm (Arias et al., 2007).

Folículos primarios. El cambio de células foliculares planas a células cuboidales es el primer indicio de que el ovocito ha entrado a fase de crecimiento. Durante el desarrollo, las células germinales se asocian a las células somáticas para garantizar su supervivencia, maduración y crecimiento, el diámetro de los folículos primarios en coneja es de 100-120 μm , mientras que el oocito llega a medir 60 μm (Arias Álvarez et al., 2007; Clarke, 2018).

Folículos secundarios. La proliferación de las células de la granulosa cuboidales da lugar al siguiente estadio de maduración, las células de la teca se agrupan alrededor del folículo con más de dos capas de células de la granulosa cúbica (Clarke 2018; McGee y Hsueh, 2000). El folículo llega a medir 200 μm ; mientras que, el ovocito crece de 80-104 μm en coneja (Arias Álvarez et al., 2007).

Folículos terciarios. En el estadio terciario o antral la mayoría de los folículos sufren degeneración atrésica. El líquido folicular está compuesto por hormonas tiroideas T4 en menor concentración y T3 igual o mayor a las concentraciones séricas (Ślebodziński, 2005) aumenta

el número de folículos antrales sanos y disminuye la atresia en folículos antrales grandes (Jiang et al., 2000). A partir de este estadio, la FSH regula el metabolismo celular y activa las vías de señalización MAPK en los folículos preantrales (Candelaria et al., 2020), suprime la atresia y apoptosis de las células de la granulosa e induce la esteroidogénesis (Liu et al., 2018), se caracteriza por la presencia de 6 – 9 capas de la granulosa y por la presencia de espacios rellenos de líquido folicular formando el antro, el diámetro es mayor a 200 – 250 μm , mientras que el ovocito llega a crecer de 130 – 135 μm de diámetro en conejas (Arias Álvarez et al., 2007; Clarke, 2018).

Folículos de Graff. En mujeres en edad reproductiva, los folículos de Graff son la principal fuente de estrógenos. El folículo dominante libera al ovocito para ser fecundado, mientras que las células de la teca y de la granulosa se convierten en cuerpo lúteo para producir progesterona (Hsueh et al., 2015). En conejas, el diámetro del folículo es superior a 800-900 μm , mientras que el oocito mide de 140 – 143 μm de diámetro y se caracteriza por un espacio antral abundante rico en factores de crecimiento, proteínas, hormonas, etc. (Clarke 2018).

El desarrollo folicular de los primeros estadios de maduración está dirigido por factores intra-ováricos, mientras que en los estadios de mayor maduración son regulados por las hormonas gonadotropinas (McGee y Hsueh, 2000). Los folículos son reconocidos por la matriz extracelular, activando diversos mecanismos de proliferación y diferenciación involucrando factores de crecimiento en depósitos extracelulares y su relación con la dominancia folicular (Armstrong y Webb, 1997). El inicio del desarrollo folicular es modulado por hormonas esteroideas y la hormona anti-muleriana (Silva y Giacobini, 2021). Las hormonas esteroideas en sinergia con la FSH participan en el crecimiento folicular de las células de la granulosa, diferenciación morfológica, formación de receptores para LH y la inducción de enzimas esteroidogénicas (3 beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa y aromatasas) en los ovocitos (Jiang et al., 2000), mientras que por actividad de la LH se activa la reanudación de la meiosis y la digestión de la pared del folículo para la ovulación (Yoshimura y Barua, 2017).

En la maduración folicular, además de las hormonas esteroideas, se tiene la participación de otras hormonas y péptidos como relataremos a continuación. El péptido natriurético tipo C es un factor estimulante de los folículos actuando de forma paracrino/autocrino induciendo la

vaso-relajación, expresándose en células de la granulosa y del cúmulo en folículos pre-antrales y pre-ovulatorios. Este péptido estimula la producción de GMPc difundándose al ovocito por las células del cúmulo aumentando la concentración de AMPc deteniendo la maduración del ovocito (Hsueh et al., 2015). La maduración inducida por LH está regulada por factores procedentes de células somáticas foliculares. En el líquido folicular existen factores de crecimiento como el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), el factor de crecimiento neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y factores de crecimiento derivados de los ovocitos como el factor de diferenciación de crecimiento 9 (GDF-9) y la proteína 2 morfogenética ósea 15 (BMP-15) (Hsieh et al., 2009). El TGF- β induce el aumento de la expresión del receptor de LH estimulado por FSH y la producción de progesterona en cultivo de células de la granulosa de rata sin modificar concentración de AMPc, mientras que, el VEGF disminuye la unión del receptor LH y reduce la concentración de AMPc, sugiriendo que TGF β y VEGF tienen efectos opuestos en la diferenciación de células que responden a gonadotropinas (Dodson y Schomberg, 1987; Knecht et al., 1987).

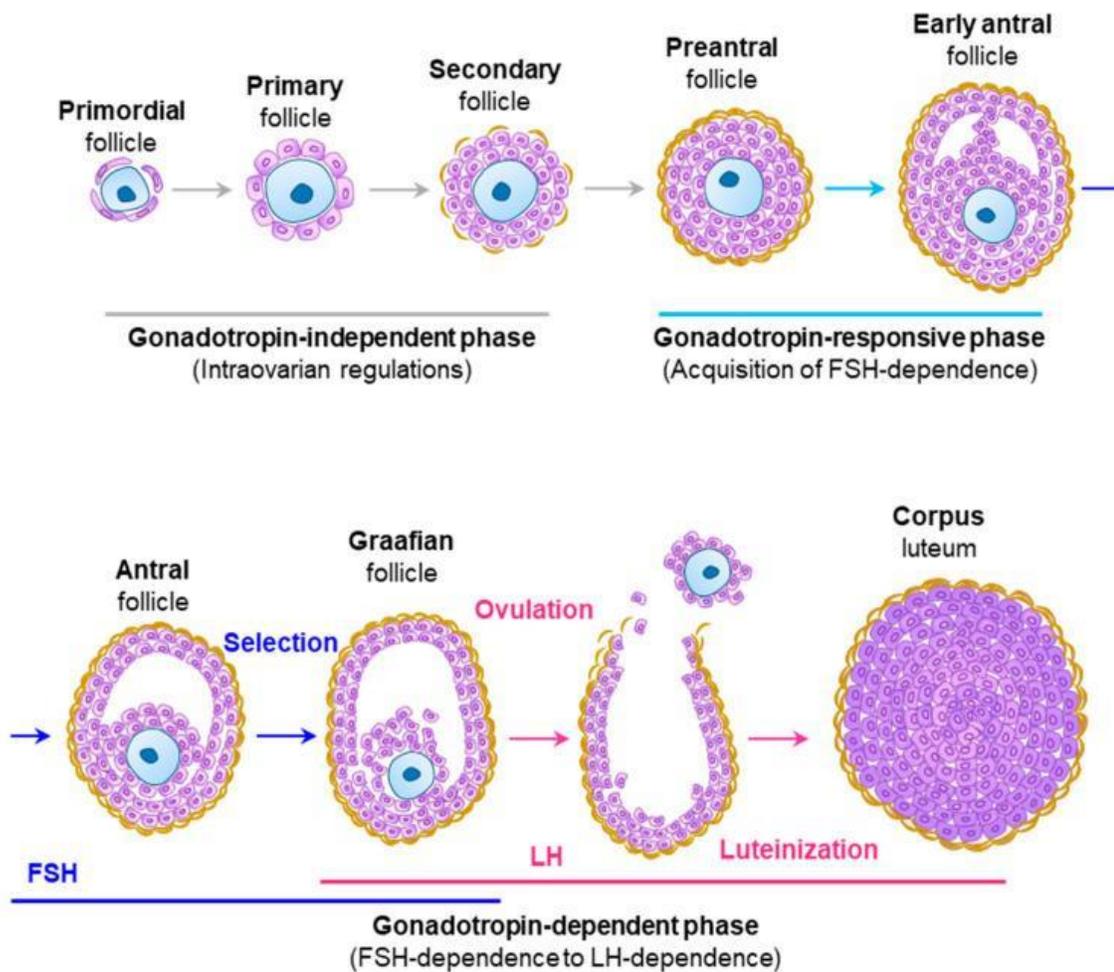


Figura 2. Estadios de maduración folicular, delimitación de la participación de factores intraováricos y hormonas gonadotrópicas en los diferentes estadios de maduración. Tomado de (Lee et al., 2021).

1.1.1 Metabolismo y estrés oxidativo en la maduración folicular

La glucosa es la principal fuente de carbono para la biosíntesis celular y la producción de energía, existen tres tipos de transportadores que controlan el flujo de carbono a la glucólisis: transportadores de glucosa, lactato y monocarboxilo (Mulukutla et al., 2016). Estudios realizados en animales con problemas de infertilidad muestran que la concentración fisiológica de glucosa es crucial para la maduración y desarrollo de los ovocitos y el desarrollo del posible feto (Warzych y Lipinska, 2020). Los folículos maduros consumen dos veces más glucosa que los folículos inmaduros, la mayoría de las especies mamíferas dependen de los transportadores

de glucosa (GLUTs), las células del cúmulo convierten la glucosa en piruvato, lactato o NADPH que se transfieren a los ovocitos (Warzych y Lipinska, 2020). En los mamíferos, el metabolismo de la glucosa puede ser controlado por dos hormonas principales, la insulina producida por los islotes de Langerhans en el páncreas en células β y el glucagón en células α . Cuando los niveles de glucosa en sangre aumentan, la insulina es segregada regulando la acción metabólica en el hígado, incrementando la captación de glucosa en los tejidos (Judge y Dodd 2020). En músculo esquelético, corazón, tejido adiposo y ovario, la señalización de insulina provoca la traslocación del transportador de glucosa (GLUT-4) en la membrana plasmática desde las vesículas internas, incrementando el flujo de captación de glucosa. Cuando se requiere el suministro de glucosa a las células en ausencia de ingesta de glucosa, el glucagón actúa sobre el hígado a través de un receptor acoplado a proteína G, incrementando AMPc, exportando glucosa estimulando la gluconeogénesis (Judge y Dodd, 2020). El GLUT-4 es un transportador de glucosa en respuesta a la insulina y a la contracción muscular. El aumento de calcio intracelular, la elevada actividad de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) en respuesta a la contracción y estrés mecánico, así como especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico aumentan la traslocación de GLUT-4 (Flores-Opazo et al., 2020).

La disponibilidad de glucógeno modula el transporte de glucógeno muscular y la traslocación de GLUT-4 (Derave et al., 1999). Tras el agotamiento de glucógeno el aumento de la resíntesis de glucógeno en el músculo es mediado por la activación sostenida de AMPK y el incremento de la expresión de GLUT-1, GLUT-4 y hexoquinasa. El aumento de sensibilidad a la insulina se debe a una mayor traslocación de GLUT-4 en la superficie celular y la activación de AMPK (mecanismos subyacentes aún no dilucidados) (Hingst et al., 2018). Los receptores de insulina constan de dos subunidades α extracelulares y dos subunidades β transcelulares, la insulina se une a la subunidad α del receptor de insulina, provocando un cambio conformacional que conduce a la fosforilación de los residuos de tirosina en su subunidad β (Russo et al., 2021). La insulina funciona como una co-gonadotropina a través de su receptor asociado para modular la esteroidogénesis ovárica y la ovulación (Roberts et al., 2013). La AMPK es un importante sensor de energía intracelular, se sugiere que tiene un papel vital en la fertilidad femenina (McCallum et al., 2018). A nivel del tejido, el metabolismo de la glucosa se lleva a cabo a través

de exigencias energéticas de cada órgano, para efectos de esta investigación se enfocará en los ovarios. Los folículos ováricos contienen lípidos, ácidos grasos libres, lipasa sensible a hormonas, el líquido folicular funciona como fuente de oxígeno, aminoácidos, factores de crecimiento y otras moléculas (Zhou et al., 2019a).

El estrés oxidativo hace referencia a la cantidad de radicales libres producidos por la cadena respiratoria pertenecientes en un 95% a las ERO. Las ERO consiste en anión superóxido (O_2^-), radicales hidroxilos (HO^-), alcoxilo (RO-peroxilo RO_2^-) y otros no radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las ERO son indispensables en la foliculogénesis, la reactivación de la meiosis y el desarrollo de mensajeros secundarios del desarrollo embrionario. Las ERO inducen apoptosis en las células de la granulosa para romper las membranas y lograr la ovulación, también participan en la regresión del cuerpo lúteo, la concentración adecuada de ERO en el líquido folicular puede ser indicativo de una buena actividad metabólica y regula el progreso de meiosis I a meiosis II (Yan et al., 2022). Sin embargo, el exceso de ERO altera el funcionamiento de las macromoléculas en el ADN, proteínas, lípidos y carbohidratos. Esta alteración puede conducir al envejecimiento ovocitario (Wang et al., 2021). El aumento de estrés oxidativo es fundamental para la ovulación; mientras que, el exceso de precursores proinflamatorios, tras el aumento de LH genera un exceso de ERO (Shkolnik et al., 2011). El incremento de estrés oxidativo induce apoptosis en las células de la granulosa y la no disyunción de la meiosis (Dai et al., 2017). El envejecimiento ovárico está relacionado con un incremento de ERO por disfunción mitocondrial, reduciendo la cantidad de ATP (Wang et al., 2021). A través de la vía de señalización PI3K/Akt participa en la regulación de la proliferación celular diferenciación y estrés oxidativo, la anormalidad de esta vía está relacionada con el bloqueo de la génesis de folículos primordiales, relacionándola directamente con IOP. A lo largo de la maduración folicular, las reservas de glutatión protegen al ovocito del estrés oxidativo (Shi et al., 2023)

1.1.2 Inflamación y foliculogénesis

Las células inmunes y las citocinas están relacionadas con la foliculogénesis y la ovulación, dentro de sus funciones se encuentra la regulación de diferenciación celular, supervivencia,

atresia y maduración de los ovocitos (Field et al., 2014), fagocitosis, presentación de antígenos, remodelación de tejidos por enzimas proteolíticas, secreción de señales solubles, como citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento (Kinnear et al., 2020). Las citocinas son producidas por los leucocitos residentes o infiltrados y se ha determinado la presencia de monocitos, linfocitos T activados, macrófagos y neutrófilos en la capa de la teca durante la fase folicular, mientras que en la fase ovulatoria se incrementa la presencia de macrófagos y neutrófilos. La fase lútea incrementa la densidad de leucocitos mediado por citocinas proinflamatorias y ERO liberado por leucocitos y células ováricas (Wu et al., 2007).

La gonadotropina coriónica humana es considerada un quimioatrayente leucocitario que puede actuar a nivel del ovario incrementando la infiltración de células inmunes (Al-Alem et al., 2015). La presencia de células inmunes como macrófagos, eosinófilos en folículos están presentes en niveles bajos en ovarios inmaduros o en reposo. Estas tienden a incrementar en folículos maduros especialmente en la vasculatura de la teca y así migrar a los cuerpos lúteos después de la ovulación (Kinnear et al., 2020). Los folículos que están localizados cerca de la médula y cerca de focos inflamatorios pueden resultar dañados y perderse en la ovulación (Park et al., 2022). El aumento de LH en la ovulación incrementa la secreción de IL-1 β . Esta estimula la síntesis de prostaglandina sintetasa 2, que actúan en procesos como la remodelación del tejido, el reclutamiento de células inmunes y la angiogénesis para lograr la ovulación (Park et al., 2022). El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la interleucina-1 β (IL-1 β) son citoquinas implicadas en el desarrollo folicular, proliferación y apoptosis en células foliculares de los mamíferos (Silva et al., 2020). Para fines del presente proyecto nos enfocaremos solo a TNF- α e IL6, los cuales describiremos a continuación.

El TNF- α es una potente citocina pleiotrópica, actúa de forma paracrina, autocrina y sistemática. Es producido por macrófagos, linfocitos T, células endoteliales y es producida de dos formas, de forma precursora unida a membrana y escindida por la enzima convertidora del factor de necrosis tumoral alfa (TACE) sintetizando a forma libre (Fragoso et al., 2014). La forma unida a membrana tiene un peso molecular de 26 kDa, compuesta por 233 aminoácidos, la forma libre consta de un peso molecular de 17 kDa, con 157 aminoácidos, y la forma activa de TNF- α constituida por un homotrímero de 51 kDa (Fragoso et al., 2014). El TNF- α y sus

receptores participan en la función ovárica, el cuerpo lúteo y la remodelación del tejido, la citocina se encuentra en el líquido folicular, células de la granulosa, células de la teca y cuerpo lúteo, además estimula la atresia en células foliculares (Sakumoto y Okuda, 2004). Regula la supervivencia celular y la apoptosis a través de NF-Kb, los procesos inflamatorios y de fibrosis contribuyen al envejecimiento ovárico, altas concentraciones de TNF- α , IL-6 e IL-1-beta y un incremento de células inmunes en ovarios se ha relacionado con una disminución del número de folículos (Jo et al., 2020).

El TNF- α transmembranal considerado el precursor de la fracción soluble y/o receptor, participa en la inflamación local a través de la comunicación entre células vecinas conocida como “señal inversa” cuando TNF- α se une a un receptor TNFR-1 y TNFR-2. Además, el TNF- α transmembranal funciona como receptor transmitiendo señales dentro de las células, dando lugar a una expresión alterada de citocinas por la misma célula (Horiuchi et al., 2010; Sedger McDermott, 2014). El TNF- α ejerce sus efectos a través la unión con su superfamilia de receptores (FAS, CD40, CD27 y RANK) y dos de sus receptores de membrana TNFR-1 y TNFR-2, la diferencia entre estos receptores radica en el dominio extracelular de dos a seis moléculas de cisteína (Idriss y Naismith, 2000), TNFR1 puede estimular muerte apoptótica o necrótica, mientras que TNFR2 señala procesos homeostáticos locales (Varfolomeev y Vucic, 2018). El TNF- α inhibe la síntesis de estradiol-17 β inducido por FSH e insulina. Se le atribuyen funciones moduladoras de la ovulación, estimula la apoptosis de células foliculares, es considerado un estimulador de prostaglandinas luteales (PGF2 α , la PGE2 y la PGI2), estimula la producción de progesterona en el cuerpo lúteo, incrementa la expresión del HLA- I, activa la vía de señalización de proteína cinasa activada por mitógenos y el factor de activación nuclear NkFB, dichas vías de señalización están relacionadas con la supervivencia celular mediante el reclutamiento de TRADD y TRAF2 activando MAPK y JNK, la producción de leucotrienos, producción de ácido araquidónico (Sakumoto y Okuda, 2004; Sedger y McDermott, 2014). El TNF- α se ha relacionado con procesos de fibrosis tales como engrosamiento de la túnica albugínea y fibrosis subsiguiente, así como la proliferación de células de la teca (Zhou et al., 2017).

La IL-6 es una citocina pleiotrópica de acción intercelular con acciones proinflamatorias y antiinflamatorias, glicoproteína de 21 a 28 kDa y 184 aminoácidos, vinculada con enfermedades autoinmune, de acción autocrina, paracrina y endocrina (Saavedra et al., 2011). Se caracteriza por estimular a los linfocitos B para la producción de anticuerpos. Es producida por monocitos, macrófagos, linfocitos T y B, fibroblastos, células endoteliales, sinoviocitos, células de la glía, adipocitos y células epiteliales entre otras. La síntesis de IL-6 es estimulada por infecciones virales, bacterianas, otras citocinas como la IL-1, TNF- α y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas. La IL-6 puede inhibir la producción de TNF- α , se encuentra relacionada con padecimientos tales como resistencia a la insulina, hiperglucemia y disfunción cardíaca (Saavedra Ramírez et al., 2011). La IL-6 está relacionada con la regulación de la hematopoyesis, la coordinación del sistema inmune innato y adquirido, la funcionabilidad y activación de las vías de señalización intracelular depende de la unión de la IL-6 con su receptor RIL-6 asociado a la proteína gp130. Existen receptores de IL-6 solubles, los cuales buscan acoplarse con la proteína gp130 para efectuar su acción, si bien los receptores de membrana de IL-6 se expresan principalmente en hígado y en células inmunes, la proteína gp130 se expresa en diversos órganos, logrando así la activación de vías de señalización de IL-6 en diversos órganos (Kang et al., 2020; Rose-John, 2020).

La activación de la transcripción de la IL-6 está regulada por los factores como el NF-kB, NF-IL6, proteína activadora 1 (AP1), proteína de especificidad 1 (sp-1) o factor regulador de IFN, mientras que la regulación a la baja de la transcripción está regulada por el receptor α activado por el receptor proliferador de peroxisomas (PPAR), estrógenos, glucocorticoides y receptor adrenal hidrocarburo. Existen factores que impiden la traducción del ARNm, tales como endonucleasas y miRNA-26 (Kang et al., 2020). La IL-6, interferón alfa (IFN α) y IFN β regulan la expansión del cúmulo tras la oleada de LH en folículos de mayor maduración (Jang et al., 2015). El factor NFkB regula diversas citocinas y receptores, promoviendo la expresión de proteínas apoptóticas, expresión de la quimiotaxis. En células inducidas con mediadores inflamatorios y estrés oxidativo se incrementa la expresión de NF-kB en el citoplasma del núcleo acelerando la transcripción de ADN para la expresión de citoquinas, mediadores inflamatorios regulando procesos patológicos (Liang et al., 2018).

En enfermedades autoinmunes, el TNF- α induce la producción de las citocinas IL-1, IL-6, IL-8 e incluso al mismo TNF- α . Las anomalías en la función ovárica han sido correlacionadas con incremento en la expresión y señalización de citoquinas proinflamatorias y una mayor infiltración de macrófagos CD68+ (Rodríguez-Castelán, et al., 2017; Snider y Wood, 2019) y una mayor incidencia de fibrosis ovárica (Araújo et al., 2018). Los macrófagos ováricos son modulados por la homeostasis reproductiva y son regulados por el estrógeno, en los cuernos uterinos de conejas de conejas hipotiroideas se ha observado una gran infiltración de macrófagos CD163+, dichas células inmunes secretan TNF- α , IL-6, MCP-1 y VEGF-A (Rodríguez-Castelán, del Moral-Morales, et al., 2019a). El TNF- α también es producido por neutrófilos, linfocitos activados, células asesinas naturales, dentro de sus funciones está la estimulación de otras citocinas como IL-2, IL-6, IL-8, e induce la neuro vascularización del peritoneo, así como fomentar la proliferación y adhesión de células endometriales (Silva et al., 2020).

El incremento de TNF α regula el supresor de citoquinas 3 (SOCS-3) y ambas vías de señalización inflamatoria terminan en la expresión de GLUT-4 que conduce al transporte de glucosa a la célula (Wondmkun 2020). Las citocinas proinflamatorias y ERO alteran la esteroidogénesis, la ovulación y la ciclicidad del estro. El exceso de inflamación y estrés oxidativo afectan la maduración folicular, fecundación y desarrollo embrionario. La expresión de citoquinas es necesaria para la correcta función ovárica; sin embargo, el incremento de expresión de citoquinas proinflamatorias perjudica la función ovárica (Snider y Wood 2019). Los peroxisomas, órganos encargados de reacciones metabólicas oxidativas, en el ovario se diferencian en cada ciclo estral y participan en la maduración de los folículos. Se sugiere que tiene un papel en la protección del estrés oxidativo y lipotoxicidad, participando en la síntesis de esteroides, la deficiencia de peroxisomas deteriora el transporte de colesterol por StaR (Wang et al., 2022). La fibrosis, proceso que precede a la inflamación y lesiones tisulares repetidas, está asociada con envejecimiento ovárico en la menopausia y la obesidad, limitando la liberación de ovocitos maduros. Las citocinas producidas en la inflamación reclutan macrófagos M1 que posteriormente a través de señales antiinflamatorias se diferencian a macrófagos M2 estimulando la producción de colágeno y fibroblastos (Umehara et al., 2022).

1.1.3 Atresia folicular

La competencia folicular se ha relacionado con la producción de inhibinas y estrógenos por el folículo más grande, causando que la concentración de FSH disminuya, dejando a los folículos restantes privados del desarrollo por presencia de FSH. En ratones, los folículos primordiales se mantienen quiescentes por factores inhibitorios como el factor de transcripción Foxo3a (McGee y Hsueh, 2000). No todos los folículos logran ser ovulados, por lo que se inician procesos de autofagia y atresia mediados por el sistema inmune (Zhou et al., 2019b). Así, el 99% de los folículos sufren atresia folicular. El proceso de atresia folicular inicia con la muerte de una célula de la granulosa caracterizado por bajos niveles de estrógenos e incremento de andrógenos (Park et al., 2022). Hay diversos mecanismos de atresia asociados a sistemas ligando receptor, como TNF- α ligando FAS, ligando APO-3 y el ligando PFG-5. Otro mecanismo que puede conducir a la atresia son alteraciones en la autofagia. Cuando existe una acumulación de fagosomas en la célula se activan vías de señalización de muerte celular; el tratamiento con lipoproteína de baja densidad oxidada propicia una acumulación de fagosomas en células de la granulosa humanas, sugiriendo una relación con problemas de fertilidad en mujeres obesas (Zhou et al., 2019a). Así mismo, los cambios en el estado metabólico pueden influir en la competencia y desarrollo folicular a través de la secreción de factores como la insulina, IGF-1 y la leptina. En cerdas, la restricción del alimento post lactancia disminuyó el tamaño de los folículos ováricos y la tasa de ovocitos fecundados, disminuyendo la concentración de IGF en el líquido folicular, concluyendo que la movilización del tejido adiposo influye en la maduración folicular debido a la disminución del balance energético (Costermans et al., 2023).

Existen 4 tipos de atresia de acuerdo con (Balazi et al., 2014) (figura 3):

Atresia quística: Se presenta en estadios de maduración avanzados con pérdida de capas de células de la granulosa y de la teca, transformación de células de la granulosa a células epiteliales planas debido a la presión ejercida por líquido folicular.

Atresia infiltrativa: Hipertrofia y ruptura de células epiteliales de la granulosa y de la teca, ruptura de la membrana basal, disposición irregular de las células de la granulosa, ausencia de vascularización y presencia de restos celulares (Meng et al., 2021).

Atresia obliterativa: Caracterizada por la degeneración de la capa de células de la granulosa, con preeminencia de fibrocitos, pérdida de la presión intrafolicular reflejada en deformación de la pared folicular.

Atresia residual: Ausencia de células de la granulosa, presencia de vacuolización nuclear.

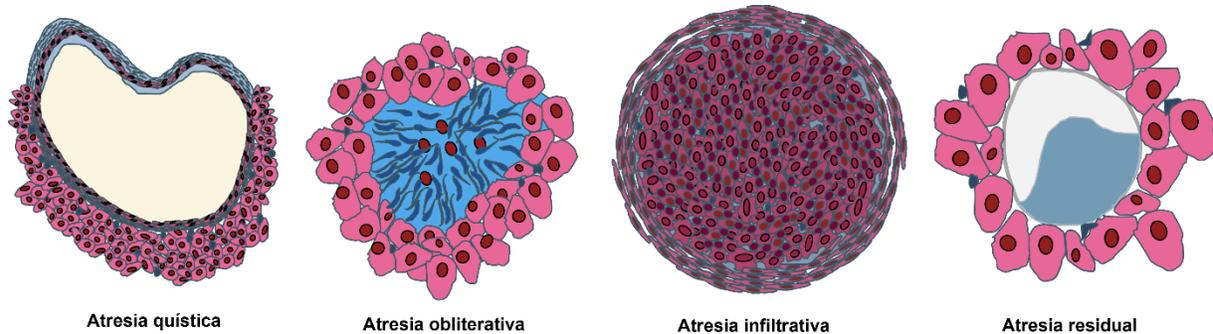


Figura 3. Esquema de tipos de atresia. Fuente propia

Las ERO pueden inducir diversas vías apoptóticas, en la vía exógena activa a Fas/FasL, la vía endógena altera la homeóstasis mitocondrial liberando a citocromo C y al factor activador de proteasas, también puede promover la apoptosis en la granulosa a través de la vía ERS, evidenciando su papel en la homeostasis y viabilidad de folículos sanos y atrésicos (Yan et al., 2022).

1.2 Patologías y alteraciones ováricas

Insuficiencia ovárica prematura. Se caracteriza por la pérdida de la función ovárica en mujeres menores a 40 años, con una prevalencia de 1:10.000 de 18-25 años que incrementa con la edad, llegando a 1:100 de 35-40 años. Dentro de los parámetros bioquímicos alterados en el cuadro patológico se encuentran valores elevados de hormona folículo estimulante y la disminución de estrógenos; mientras que, los signos clínicos presentan amenorrea u oligomenorrea, infertilidad, depresión y falta de energía. La inflamación también es considerada un factor que induce fibrosis disminuyendo la reserva folicular (Park et al., 2022), $TNF\alpha$ se

encuentra disminuido en suero de mujeres con insuficiencia ovárica prematura (Naz et al., 1995).

Síndrome de ovario poliquístico (SOP). Es un trastorno endocrino que afecta del 5 – 10% a mujeres en edad reproductiva y una de las causas más frecuentes de infertilidad (Osuka et al., 2019). Se caracteriza por anovulación, hiperandrogenismo, presencia de quistes ováricos y altos niveles de LH en suero. Las mujeres diagnosticadas con síndrome de ovario poliquístico (SOP) presentan anomalías metabólicas tales como síndrome metabólico, obesidad y resistencia a la insulina. El papel que tienen las hormonas esteroideas en la desregulación del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (Otto-Buczowska et al., 2018). El síndrome metabólico está presente entre el 28% y 46% de las pacientes diagnosticadas con SOP (Romanowski et al., 2015). Las pacientes con SOP presentan concentraciones elevadas de TNF α y el metabolito de la peroxidación lipídica, malondialdehído (MDA), lo que indica inflamación ovárica crónica y estrés oxidativo (Snider y Wood, 2019). En el SOP, la producción de adiponectina en los adipocitos contribuye al desarrollo de resistencia a la insulina, anormalidades en el transportador de glucosa GLUT-4, alteraciones en la lipólisis y disfunción de las células beta del páncreas (Zore et al., 2017). El SOP es caracterizado por un estado proinflamatorio que está relacionado con un incremento en la producción de andrógenos (González 2015). El SOP se ha relacionado con genes proinflamatorios, así como IL-6 y TNF- α , siendo TNF- α un mediador de la resistencia a la insulina incluso en ausencia de obesidad (González, 2015).

Resistencia a la insulina. Definida como la incapacidad de la insulina para estimular el transporte de glucosa al interior de las células (Roberts et al., 2013). La acción de la insulina unida a su receptor desempeña el papel de control en procesos de mitosis y crecimiento en la célula, por lo que tiene una estrecha relación con SOP (Lebovitz 2001).

Síndrome metabólico. Es un conjunto de factores interconectados que favorecen la aparición de enfermedades cardiovasculares ateroscleróticas y diabetes mellitus de tipo 2 (Kassi et al., 2011). Se caracteriza por hipertrigliceridemia, hipertensión y bajos niveles de colesterol de alta densidad (HDL), disfunción endotelial, obesidad, inflamación y estrés oxidativo. El síndrome metabólico y obesidad producen marcadores de inflamación como el TNF α , IL-6 e IL-18 por lo que se relaciona con alteraciones ovárica (Roberts et al., 2013).

Endometriosis. La endometriosis es considerada una patología relacionada con la infertilidad femenina. Es caracterizada por el crecimiento, adhesión y progresión de glándulas endometriales y estroma fuera de la cavidad uterina. Este tejido endometrial puede desarrollarse alrededor del ovario (Kaushik et al., 2020).

Obesidad. La obesidad se ha relacionado con un aumento en la expresión de $TNF\alpha$, IL-6 e IL-8, así como sus vías de señalización inflamatoria en ovarios de mujeres y ratones con obesidad. La IL-6 y el $TNF\alpha$ se correlacionan positivamente con las concentraciones de lípidos en el líquido folicular de las mujeres obesas, presuntamente perjudicando la función ovárica (Snider y Wood, 2019).

Hipotiroidismo. La disminución de hormonas tiroideas tiroxina (T4) y triyodotironina (T3) y el aumento en la hormona estimulante de la tiroides (TSH) han sido correlacionados con abortos espontáneos, irregularidades menstruales y quistes ováricos (Ślebodziński, 2005), resistencia a la insulina, obesidad, dislipidemias, endometriosis, infertilidad e hiperplasia uterina (Rodríguez-Castelán et al., 2019b), así como incremento de la atresia folicular (Colella et al., 2020). El hipotiroidismo aumentó la proliferación de hepatocitos, la infiltración de mastocitos indujo esteatosis hepática, fibrosis y una disminución en la vascularización del hígado (Rodríguez-Castelán et al., 2017). En el páncreas, el hipotiroidismo induce infiltración de células inmunes, una mayor presencia de colágeno aumenta la expresión de $ER\alpha$, proinsulina y disminuye la expresión de GLUT4, aromatasa, GPER1 y $ER\beta$. El hipotiroidismo también reduce el número de células de islotes de Langerhans (Rodríguez-Castelán et al., 2022; Rodríguez-Castelán et al., 2015; Rodríguez-Castelán et al.).

1.3 Hipotiroidismo, metabolismo e inflamación

Las hormonas tiroideas regulan el desarrollo y metabolismo de los órganos a través de receptores nucleares, la interacción y sinergia de las hormonas tiroideas con otras hormonas, ERO, citocinas y factores de crecimiento participan en la maduración folicular (Silva et al., 2018a). No obstante, la disminución de las hormonas tiroideas tal como sucede en el hipotiroidismo tiene efectos negativos en diversos órganos. El hipotiroidismo aumentó la

expresión de GLUT-4 en páncreas de conejas (Rodríguez-Castelán et al., 2022). Debido a que la TSH puede inhibir la señalización de glucosa en los adipocitos, la acumulación de glucógeno en ovario podría modificar la señalización de insulina y, por ende, afectar la maduración folicular y la esteriodogénesis, ya que la acumulación de lípidos en ovarios está regulada por la captación de glucosa (Rodríguez-Castelán et al., 2018). En ratas con SOP y resistencia a la insulina, la expresión de GLUT-4 se encuentra disminuida (Yang et al., 2018). Los islotes pancreáticos de conejas hipotiroideas demuestran un aumento de la vascularización, así como una infiltración de células inmunes incrementada, reflejando que el hipotiroidismo induce pancreatitis e insulitis (Rodríguez-Castelán et al., 2015). El hipotiroidismo farmacológico en ratas disminuyó la concentración de insulina, aumentó la peroxidación lipídica y disminuyó la actividad de enzimas antioxidantes. El glutatión reducido es un cofactor de enzimas antioxidantes como las desyodasas (Safayee et al., 2016). En órganos como hígado y corazón, las enzimas antioxidantes fueron disminuidas, mientras que incrementó el MDA como producto de la peroxidación lipídica. El TNF α disminuye las concentraciones de T3 a nivel tisular mediante la activación Nf-kB, inhibe la expresión de deydasa tipo 1 (D1) que, a su vez, es regulada por la T3. De igual manera, la IL-6 suprime la generación de T3 a través de la regulación de D1 y D2 (Wajner et al., 2011). El estrés oxidativo está directamente relacionado con la inflamación sistémica y alteraciones hormonales, la mayoría de radicales libres son obtenidos a través del mecanismo mitocondrial en la respiración celular, el recambio de mitocondrias dañadas por ERO está dirigido por PPAR gamma. El incremento de andrógenos en tejido ovárico de ratas estimula la inflamación crónica de bajo grado y, a su vez, induce muerte celular apoptótica, evidenciando disfunción folicular y fibrosis celular intersticial ovárica (Wang et al., 2020).

1.4 Generalidades de yodo

El yodo es un micronutriente esencial para el consumo humano, su función principal radica en la acción de la peroxidasa tiroidea y la yodación de la tiroglobulina para la síntesis de hormonas tiroideas. El requerimiento diario para adultos es de 150 mg, mientras que para el embarazo los requerimientos aumentan a 200 – 250 mg por día, siendo el umbral máximo

tolerado es de 1100 mg/día. Los requerimientos de yodo humano se obtienen a través del consumo de sal yodada, pan, algas, mariscos, pescados, etc. (Mathews et al., 2021). Existen estudios que describen la tolerancia de yodo a dosis bajas en personas eutiroideas (1,5-8 mg/día) e intermedias (10-32 mg/día), manteniendo las concentraciones de T3 y T4. Dosis elevadas (>30 mg/día), principalmente en forma de yoduro (I^{-3}), promueven la aparición de hipotiroidismo y bocio que remiten después de quitar la suplementación de yodo (Aceves et al., 2013). El yodo se absorbe rápidamente por el tracto gastrointestinal, se distribuye a través de las células y se excreta por los riñones. El yodo (I^{-3}) se introduce a la célula por acción del simportador de sodio-yodo a través de transporte activo (NIS), anoctamina 1 (ANO1), el regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) y el transportador multivitamínico de sodio (SMVT) y la pendrina en la glándula tiroidea, posteriormente los iones de yodo se oxidan por acción de la peroxidasa tiroidea en presencia de H_2O_2 . Los residuos de tirosina son yodados para formar monoyodotirosina y diyodotirosina para posteriormente acoplarse y formar T3 y T4 (Krela-Kaźmierczak et al., 2021). El exceso de yodo funge como un disruptor endocrino inhibiendo la acción del simportador (Karbownik-Lewińska et al., 2022). La deficiencia de yodo también potencia la acción de otros disruptores endocrinos, mientras que la restitución de yodo los contrarresta. Existen otros ejemplos de disruptores endocrinos que actúan inhibiendo el simportador de yodo sodio como el perclorato, tiocianato, bisfenol A o nitrato. El yodo actúa de forma protectora frente a cánceres y procesos inflamatorios (Krela-Kaźmierczak et al., 2021).

La deficiencia de yodo está relacionada con bajo peso al nacer, hipotiroidismo subclínico materno, aborto espontáneo, enanismo, bocio, morbilidad materna, efectos adversos del neurodesarrollo del feto, aumento en la conversión de T4 a T3 y mayor producción de TSH. La prevalencia del hipotiroidismo subclínico en el mundo es del 8%, con niveles de TSH de 2.5 – 4 mU/L para hipotiroidismo subclínico leve y niveles de 4 – 10 mU/L para hipotiroidismo subclínico importante (Hassanien et al., 2003; Țarnă et al., 2022). La deficiencia de yodo está asociada con preeclampsia y aumento de estrés oxidativo en la gestación, la proliferación y diferenciación de la placenta (Olivo-Vidal et al., 2016). En mujeres embarazadas con deficiencia de yodo (determinado en orina) se aumenta el estrés oxidativo y disminuye la actividad de la enzima superóxido dismutasa (Vidal et al., 2014). El exceso de yodo ha sido relacionado con

hemorragias, alteraciones en el embarazo y alteración de fenotipo de células inmunes (Hassanien et al., 2003; Mathews et al., 2021), inhibición de la actividad de la peroxidasa tiroidea reduciendo la síntesis de hormonas tiroideas (Calcaterra et al., 2022). Estudios in-vitro de cultivos celulares de células tiroideas incubadas con exceso de yodo han reportado cambios morfológicos en las células, exposición de fosfatidilserina (fosfolípido señalizador de apoptosis), fragmentación del ADN, incremento en la producción de ERO y MDA (Karbownik-Lewińska et al., 2022). El exceso de yodo sumado a mayor estrés oxidativo de linfocitos incrementa el riesgo de padecer enfermedades autoinmunes (Karbownik-Lewińska et al., 2022). En ratas con administración de exceso de yodo (7 mg/kg, 100 veces la dosis diaria recomendada), el exceso de yodo aumenta el estrés oxidativo en linfocitos en sangre periférica, favorece la actividad de citocinas, asimismo incrementa su concentración en suero IL-6 y TNF α (Saha et al., 2019).

A diferencia del yoduro, el yodo molecular tiene características hidrofóbicas, propiedades altamente polarizables, se yodina inespecíficamente dobles enlaces. En mamíferos a través de reacciones extraenzimáticas el yodo tiene la capacidad de yodar inespecíficamente proteínas, aminoácidos y lípidos. En mamíferos se han identificado cuatro lípidos yodados: 6-yodo-5-hidroxi-8,11,14-eicosatrienoico (d-iodolactona), α -yodohexadecanal (α -IHDA), ácido 5-yodo-7,10,13,16,19-docosapenta-enoico (g-lactona) y el ácido 14-yodo-15-hidroxi-5,8,11-eicosatrienoico (olactona) (Kessler y Hooge, 2007). En ratas Wistar, el exceso de yodo (KIO₃) incrementa el estrés oxidativo en páncreas, los niveles de TSH, amilasa y glucosa sérica, los niveles de insulina y el estado antioxidante se vio disminuido, aumentó la expresión de PPAR-gamma (Arbez-Evangelista et al., 2024). En células de cáncer de mama en ratones, la captación de yoduro es dependiente de NIS, mientras que la captación de yodo (I₂) es transitoria, se sugiere que la captación de yodo (I₂) es independiente de NIS, penndrina, Na⁺ y energía, proponiendo un sistema de difusión facilitada (Arroyo-Helguera et al., 2006). La yodación del ácido araquidónico forma yodolípidos, estos funcionan como ligandos de receptores gamma activadores del proliferador peroxisomal, que regulan la expresión del gen de la SOD (Nuñez-Anita et al., 2009), a su vez, PPAR participa en vías apoptóticas o de diferenciación (Aceves et al., 2013). El tratamiento de doxorubicina sumado con yodo molecular (I₂) en el agua de bebida

en ratas con cáncer de mamá inducido por metilnitrosourea, disminuye el tamaño de los tumores, disminuyó la expresión de marcadores de quimioresistencia (Bcl2 y survivina), y aumenta la expresión de la proteína apoptótica Bax y del receptor activado por proliferadores de peroxisomas tipo gamma (Alfaro et al., 2013).

2 Antecedentes

2.1 Hipotiroidismo y función ovárica

Las hormonas tiroideas actúan a nivel de tejidos ováricos, uterinos y placentarios modulando el desarrollo y metabolismo a través de receptores nucleares, interactúan con hormonas y factores de crecimiento como estrógenos, progesterona y factor de crecimiento similar a la insulina. La T3 actúa en células del cúmulo ovocitario, funcionando como inhibidor de aromatasa activada por FSH en células de la granulosa en dosis altas, esclareciendo la participación de las hormonas tiroideas en la esteroidogénesis, morfología celular y los efectos en el ovario a causa de alteraciones de hormonas tiroideas (Cecconi et al., 1999). Así mismo, las hormonas tiroideas, especialmente la T3, en sinergia con FSH, contrarrestan la apoptosis de células de la granulosa inhibiendo vías de señalización de apoptosis como PI3K/AKT (Di Paolo et al., 2020; Lin y Rui, 2010). Las hormonas tiroideas aumentan el metabolismo basal celular, regula el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono y el gasto energético funcionando como desacopladores de la cadena respiratoria mitocondrial y acelerando el recambio de enzimas que utilizan ATP (Bianco y Kim, 2006; Calcaterra et al., 2022). Estudios previos han demostrado la presencia de peroxidasa tiroidea en el cúmulo de células de la granulosa humanas, así mismo la presencia de 5'-monodeiodinasa en el líquido folicular, capaz de generar T3 (T3 nacida en el ovario) por desyodación del anillo externo de la T4, siendo mayor la concentración de T3 durante el periodo de ovulatorio en yeguas, apoyando la hipótesis donde el folículo es una unidad independiente productora de hormonas tiroideas los datos sugieren que la T3 tiene función en el desarrollo folicular temprano la diferenciación y la capacidad esteroidogénica (Ślebodziński, 2005). Por lo anterior, alteraciones de la reproducción femenina tal como el SOP, obesidad, síndrome metabólico e hipotiroidismo están relacionados con desbalance energético y dislipidemias (Singh et al., 2020). La inflamación reduce la expresión de desyodasas provocando bajas concentraciones de T3, generando un hipotiroidismo tisular. Este mecanismo genera un círculo vicioso de inflamación, estrés oxidativo e hipotiroidismo (Mancini et al., 2016). El eutiroidismo puede verse afectado por el incremento de mediadores de la inflamación como TNF- α , disminuyendo la T3 y TSH en hombres (Van Der Poll et al., 1990).

Las mujeres con menopausia prematura tienen una predisposición por tiroiditis de Hashimoto y enfermedad de Graves (Szeliga et al., 2021). La disminución de las hormonas tiroideas ha sido relacionada con diversas patologías del aparato reproductor femenino, como anovulación, obesidad, trastornos ovulatorios e infertilidad (Shufelt et al., 2017). La infertilidad y subfertilidad se asocia con inflamación y estrés oxidativo (Agarwal et al., 2005). Mujeres con patologías ováricas como SOP, endometriosis y adultas mayores muestran un estado de inflamación crónica de bajo grado que predispone a un incremento de ERO y, por ende, estrés oxidativo, el cual conlleva a un incremento de la diferenciación de fibroblastos a través de la estimulación TGF- β , generando fibrosis y pudiendo participar en la disminución de la foliculogénesis folicular culminando en una baja calidad de ovocitos y problemas de infertilidad (Orisaka et al., 2023). Existe un incremento en la prevalencia de insuficiencia ovárica prematura en mujeres con hipotiroidismo autoinmune, presentando tiroiditis de Hashimoto con una prevalencia de 24.1% con anticuerpos anti-TPO, existiendo una relación negativa respecto a niveles de TSH y la hormona antimuleriana concluyendo que una alteración de TSH puede exacerbar la insuficiencia ovárica prematura (Szeliga et al., 2021).

En modelos animales con hipotiroidismo, como ratas y conejas, se han observado diversas alteraciones que corresponden con lo observado en mujeres.

Maduración folicular. En conejas, el hipotiroidismo disminuye el tamaño de los folículos (Dijkstra et al., 1996; Rodríguez-Castelán et al., 2017). Ello podría relacionarse con cambios en la maduración folicular, aunque el mecanismo involucrado aún no ha sido detallado. En ratas se ha evidenciado el incremento de estradiol y prolactina en suero y la disminución de IGF-1, así mismo incrementa el tiempo de vida del cuerpo lúteo (Hapon et al., 2010). El hipotiroidismo en ratas disminuye la transcripción de CYP51 que codifica para la enzima aromatasas y disminuye la transcripción del receptor a FSH (Weng et al., 2019).

Atresia folicular. De acuerdo con los hallazgos de nuestro equipo de trabajo, el hipotiroidismo incrementa la expresión del receptor de estrógenos membranal (GPER1) en ovarios de conejas hipotiroideas vírgenes. El incremento de este marcaje se evidenció en folículos atrésicos, zona pelúcida, células de la granulosa, células de teca y en el estroma ovárico (Bautista, 2022). La activación de receptor GPER1 con estradiol o su agonista

incrementa la concentración de calcio en las mitocondrias de células epiteliales de la próstata produciendo apoptosis, liberando citocromo C y caspasa 3, proponiendo un nuevo mecanismo de inducción de la apoptosis por activación de GPER1 (Yang et al., 2017).

Cambios metabólicos y estrés oxidativo. En conejas, el hipotiroidismo favorece la acumulación de grasa intracelular ovárico (Rodríguez-Castelán et al., 2017), lo que podría favorecer la presencia de ERO. El incremento de estrés oxidativo ocasiona atresia folicular, meiosis anómala, disminución de la maduración, quistes y endometriosis ováricos (Wang et al., 2021). Las conejas hipotiroideas también muestran un aumento en la concentración de glucógeno en el ovario (Rodríguez-Castelán et al., 2018), ello podría aumentar la formación de ERO.

Inflamación. En conejas, el hipotiroidismo promueve un aumento en la infiltración de células inmunes en tejido periovárico y en el estroma ovárico (Rodríguez-Castelán et al., 2017; Bautista, 2022). El hipotiroidismo se ha correlacionado con obesidad en mujeres, así mismo en mujeres y ratones obesas existe un incremento de $TNF\alpha$, IL-6 e IL-8 en ovario (Ruebel et al., 2016).

2.2 Yodo y ovario

El ovario es el órgano con mayor absorción y concentración de yodo después de la tiroides. La captación de yodo incrementa en la etapa fértil o reproductiva, y disminuye en la pubertad y menopausia; el estradiol aumenta la proliferación y regula a la baja la expresión del gen simportador del yoduro de sodio (NIS) (Ślebodziński, 2005). El ovario expresa simportadores de yodo/sodio, se ha descrito en tratamientos con yodo radioactivo que los folículos en menor estadio de maduración absorben más yodo (Mathews et al., 2021). Se ha detectado la expresión de NIS en el epitelio de ovario superficial y células de la granulosa en ovarios quísticos de mujeres, así mismo como en células de la granulosa en ratas y mujeres con cáncer ovárico. La sobreexpresión de NIS es un marcador de mal pronóstico del cáncer, siendo los receptores de estrógenos alfa los activadores de la transcripción de NIS (Riesco-Eizaguirre et al., 2014). La captación de yodo en el ovario es potenciada por estrógenos y el estado

hipotiroideo. El yodo molecular puede ser absorbido por difusión facilitada, sugiriendo un mecanismo independiente de NIS en líneas celulares de cáncer (Arroyo-Helguera et al., 2006). La administración de povidona yodada en ovarios de ratas reduce el diámetro del quiste sin producir cambios en la reserva ovárica (Atilgan et al., 2019).

Se estima que 1800 millones de personas en el mundo corren el riesgo de sufrir una carencia de yodo. La suplementación de yodo en mujeres eutiroideas sometidas a un proceso de hiperestimulación ovárica con una suplementación de yodo, no mostraron afectaciones en el recuento ovocitario ni la influencia en tasas de concepción e implantación; sin embargo, se incrementó 4 veces la tasa de nacimientos vivos en mujeres que tomaron la suplementación de yodo por más de seis meses (Bradbury et al., 2022; Țarnă et al., 2022). El tratamiento con yodo en ratas con hipotiroidismo inducido aumentó el nivel sérico de productos de peroxidación lipídica y disminuyó la expresión del gen NIS en tiroides (Karbownik-Lewińska et al., 2022). Otro hallazgo que sustenta el uso de antioxidantes en el ovario es el efecto antioxidante de la vitamina C en un modelo de envejecimiento ovárico prematuro en rata demostrando que previene la reducción del volumen ovárico, la reducción del número de folículos y células de la granulosa, también se demostró un incremento en el número de folículos primordiales, primarios, secundarios y antrales (Abdollahifar et al., 2019) En otro estudio el uso de resveratrol y metformina incremento la reserva ovárica en ratas con SOP y disminuyo el número de folículos secundarios (Furat Rencher et al., 2018)

3. Justificación

El hipotiroidismo en mujeres está asociado con trastornos reproductivos como anovulación, quistes ováricos e infertilidad (Ortiz-Flores et al., 2019). En humanos el hipotiroidismo autoinmune aumenta la expresión marcadores de inflamación tales como TNF-alfa, IL-1beta, IL-6, IL-12, IL-10 (Lei et al., 2019). En conejas, el hipotiroidismo retrasa la maduración folicular, reduce la expresión de aromatasa, induce mayor infiltración de células inmunes en estroma y tejido periovárico (Rodríguez-Castelán et al., 2017; Bautista 2022), aumenta la acumulación de glucógeno (Rodríguez-Castelán et al., 2019b), y reduce la expresión de GLUT4 en útero (Espindola-Lozano et al., en proceso) y páncreas (Rodríguez-Castelán et al., 2022). En ratas, el tratamiento con yodo a dosis bajas tiene un efecto antioxidante, disminuyendo el tamaño de quistes sin afectar la reserva ovárica (Atilgan et al., 2019). En el presente estudio queremos analizar si el tratamiento en dosis baja de yodo molecular/yoduro revierte los efectos del hipotiroidismo en el ovario de conejas recuperando el tamaño de los folículos ováricos y los cambios en la expresión de IL-6 y TNF- α . Dichos hallazgos contribuirán a comprender la patogenia del hipotiroidismo en el ovario y su relación con enfermedades que contribuyen a la infertilidad femenina, estableciendo posibles coadyuvantes en el tratamiento del hipotiroidismo, mejorando la calidad de vida de mujeres hipotiroideas.

4. Hipótesis

En conejas adultas, el tratamiento de yodo contrarresta la reducción del tamaño de los folículos inducido por el metimazol, al mismo tiempo que disminuye la infiltración de células inmunes y la expresión de TNF- α e IL-6 y en ovarios.

5. Objetivo General

Investigar si el tratamiento de yodo evita la reducción en el tamaño de los folículos inducido por metimazol, y su efecto en la infiltración de células inmunes en ovarios y la expresión de TNF- α e IL-6 de conejas hipotiroideas adultas.

5.1 Objetivos específicos

En conejas sin tratamiento y con tratamiento de metimazol o yodo

- Analizar el número y tamaño de los folículos ováricos viables y atrésicos en cortes teñidos con tricrómica de Masson
- Cuantificar la infiltración de células inmunes en estroma ovárico en cortes teñidos con hematoxilina
- Determinar la expresión de TNF- α e IL-6 en los diversos tipos de folículos mediante inmunohistoquímica

6. Metodología

6.1 Animales y tratamiento

Para el siguiente trabajo de investigación se consideraron a 6 conejas de raza Chinchilla hembras (*Oryctolagus cuniculus*) de seis meses de edad para cada grupo experimental, dos grupos control y dos grupos hipotiroideos. A un grupo de animales se le proporcionó 300 mL de agua del grifo para beber cada día por 30 días (grupo Ctrl), otros animales recibieron yodo dosis 0.2 mg/kg/30 días disuelto en 300 mL de agua grupo I₂ (Rodríguez-Castelán et al., 2023), otros animales recibieron 300 mL de agua potable con una dosis de metimazol al 0.02% (dosis aproximada de 10 mg/kg/30 días) para inducir el hipotiroidismo (grupo MMI); y otros animales además de haber recibido la dosis de metimazol (10 mg/kg/30 días), se les administró el tratamiento de yodo en una dosis de 0.2 mg/kg/30 días al grupo MMI+I₂. A todos los grupos se les administró diariamente 120 g de alimento y se mantuvieron las condiciones de temperatura controlada de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo de luz oscuridad de 16:8 horas durante la duración de todo su tratamiento. Al final del tratamiento se anestesiaron con pentobarbital sódico (60 mg/kg, i.p.) y se procedió a eutanasia con una sobredosis de éste. A través de la disección se extrajeron los ovarios izquierdos, los cuales fueron tratados para inmunohistoquímica (Figura 4). Inmediatamente después de la eutanasia, se extirparon los ovarios izquierdos, se fijaron en una solución de Bouin-Duboscq, se deshidrataron y se incluyeron en paraplast X-tra (Sigma-Aldrich). A continuación, el tejido se cortó longitudinalmente a 5 micrómetros utilizando un micrótopo (Leica, modelo 325). Las secciones de tejido se montaron en portaobjetos recubiertos de gelatina de piel bovina (Sigma-Aldrich) y se seleccionaron tres secciones (dos laterales y una de la porción media, separadas). Los cortes fueron usados para histología con tricrómica de Masson o inmunohistoquímica.

6.2 Análisis histológico

Para la cuantificación y medición de folículos viables se tomaron 3 cortes por ovario utilizando las laminillas tratadas con inmunohistoquímica (con contraindicación de hematoxilina de Mayer, ver siguiente sección). Se consideraron las siguientes características en su estructura morfológica folicular según Zhou et al., 2019b. Las mediciones de folículos se realizaron a

través de reconstrucciones de los tejidos completos, se tomaron imágenes a 10x con un microscopio óptico (Axio Imager A1, Zeiss) equipado con una cámara digital Olympus con una resolución de 5,1 megapíxeles, cada sección ovárica se midió utilizando los programas Axiovision Release 4.8 (Zeiss Soft-ware Inc). Se midieron las áreas y se calcularon los diámetros de cada folículo presente en la reconstrucción del corte ovárico.

Folículos primordiales: Presencia de lámina basal definida, células foliculares planas alrededor del ovocito, presencia de la membrana definida cromatina en el núcleo del ovocito.

Folículos primarios: presencia de lámina basal definida, células foliculares diferenciadas de células planas a cubicas, una sola capa de células de la granulosa, presencia del ovocito.

Folículos secundarios inmaduro: Presencia de lámina basal definida, de 2 a 5 capas de células de la granulosa alrededor del ovocito, estructura definida de células de la teca, presencia de membrana y zona pelúcida definida en el ovocito. Ausencia de antro.

Folículo secundario maduro: presencia de lámina basal definida, de 6 a 9 capas de células cubicas de la granulosa, estructura definida de células de la teca interna y externa, membrana celular y zona pelúcida del ovocito bien definida. Ausencia de antro.

Folículo terciario: Presencia de lámina basal definida, más de 10 capas cubicas de la granulosa, aparición del espacio antral, membrana celular y zona pelúcida del ovocito bien definida.

Folículo de Graaf: Presencia de lámina basal definida, organización uniforme de células de la granulosa y de la teca. Ausencia de ruptura de las células de la granulosa.

Se utilizaron cortes teñidos con tricrómica de Masson para clasificación de los diferentes tipos de atresia, y para la semicuantificación del marcaje de TNF- α e IL-6 se utilizaron 10 folículos atresicos por grupo experimental, considerando los siguientes criterios según (Balazi et al., 2014):

Atresia quística: Se presenta en estadios de maduración avanzados con pérdida de capas de células de la granulosa y de la teca, transformación de células de la granulosa a células epiteliales planas debido a la presión ejercida por líquido folicular.

Atresia infiltrativa: Hipertrofia y ruptura de células epiteliales de la granulosa y de la teca, ruptura de la membrana basal, disposición irregular de las células de la granulosa.

Atresia obliterativa: Caracterizada por la degeneración de la capa de células de la granulosa, con preeminencia de fibrocitos, pérdida de la presión intrafolicular reflejada en deformación de la pared folicular.

Atresia residual: Ausencia de células de la granulosa, presencia de vacuolización nuclear.

El conteo de células inmunes fue realizado en vasos sanguíneos presentes en 10 campos de estroma ovárico identificando la cromatina intensa de estas células en laminillas teñidas con hematoxilina de Meyer, las células inmunes se identificaron a través de microfotografías tomadas con el objetivo de 40x en el microscopio óptico marca Nikon.

6.3 Inmunohistoquímica

Para la inmunohistoquímica en TNF- α e IL-6, los cortes de tejido ovárico se desparafinaron y se incubaron en citrato de sodio 10 mM calentado por microondas y con pH 6.4 para recuperar los antígenos. Las peroxidasas endógenas se bloquearon con peróxido de hidrógeno al 0,3%. Los sitios de unión endógena para los anticuerpos secundarios se bloquearon con suero de cabra normal al 5% diluido en PBS con 0,3% de Tritón X-100 (PSBT). Se incubaron secciones independientes con el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-rabbit TNF- α e IL-6 (1:200). El anticuerpo secundario utilizado fue Goat anti-rabbit (Abcam 1:500). La inmunotinción se realizó según las instrucciones del kit Vectastain ABC (Vector Labs), utilizando 0,05% de 1,3'-diaminobencidina (Sigma-Aldrich) y 0,01% de H₂O₂ como sustrato enzimático. Las secciones se lavaron y se tiñeron con hematoxilina de Mayer, posteriormente fueron aclaradas y fotografiadas. La presencia y localización de estos marcadores en los diferentes tipos de folículos fue fotografiada y semi-cuantificada como: (+) escaso, (++)

moderado y (+++) abundante. Esta presencia de los marcadores inflamatorios fue hecha tanto en folículos sanos como atrésicos.

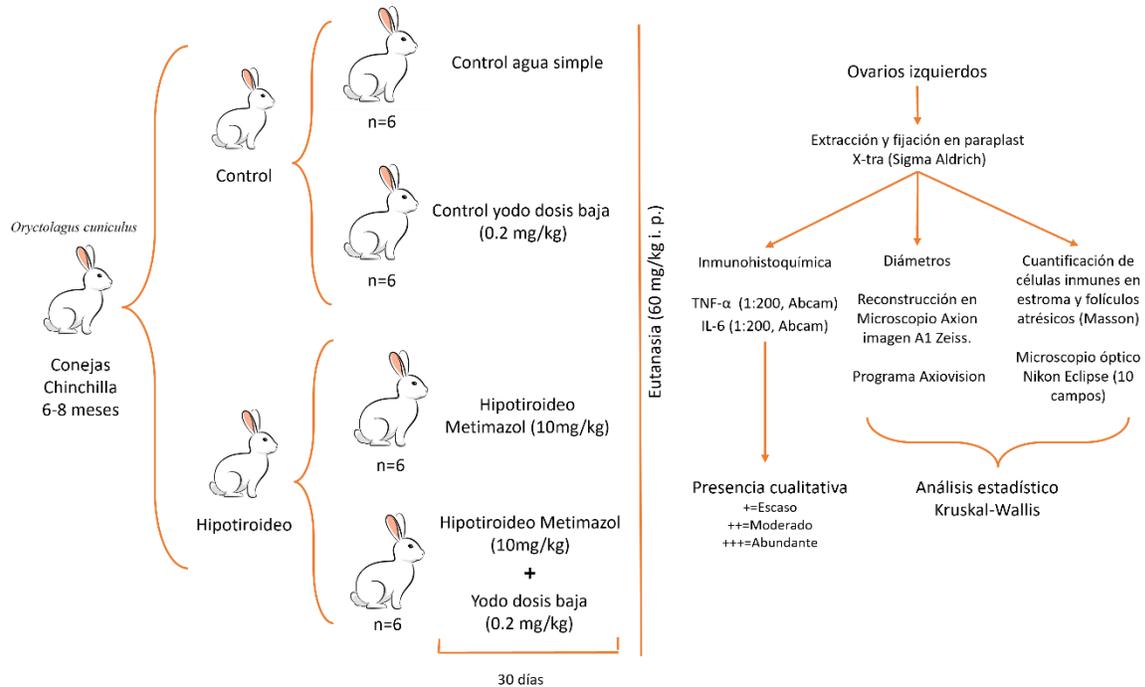


Figura 4. Esquema del diseño experimental.

6.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism v 5.01 (GraphPad Software, Inc., CA, EE. UU.). Los resultados se expresaron en porcentaje relativo de folículos viables / atresia, así como media para el área y diámetro de folículos. Se utilizó la prueba de Kruskal Wallis o ANOVA de una vía, previa determinación de la normalidad, para determinar las diferencias significativas entre las conejas Ctrl, MMI, MMI + I₂ y I₂. La prueba posthoc utilizada fue Bonferroni para ANOVA y Dunn`s para Kruskal Wallis. El valor de $p \leq 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

7. Resultados

7.1 Yodo y maduración folicular

Se realizó inmunohistoquímica para la semicuantificación de la expresión de TNF- α e IL-6. En estas mismas laminillas se cuantificó el porcentaje relativo de los folículos viables, se midieron las áreas de cada folículo y se obtuvo su diámetro. Los folículos se clasificaron de acuerdo con sus características morfológicas como primordiales, primarios, secundarios terciarios y de Graff. El análisis de folículos primordiales no evidenció diferencias respecto al porcentaje relativo de folículos, su área y su diámetro. Tampoco se encontraron diferencias en los folículos primarios, secundarios, terciarios y de Graff (Tabla 1). Respecto a los folículos secundarios observamos algunos que tenían 2-5 capas de granulosa y otros con más 5 capas. Sin embargo, este número de capas no estuvo directamente relacionado con el tamaño del folículo, ya que algunos con pocas capas de granulosa tenían un diámetro grande. Por lo que decidimos diferenciar entre folículos secundarios maduros e inmaduros dependiendo del número de capas de la granulosa (Tabla 1). Cuando realizamos la comparación de las variables evaluadas por categoría de folículo secundario inmaduro y maduro tampoco encontramos diferencias (Figura 5); porcentaje (F=0.8; P=0.49), área (F=1.1; P=0.33) y diámetro (F=1.0; P=0.41) de folículos inmaduros, porcentaje (F=3.1; P=0.36), área (K=7.1; P=0.06) y diámetro (F=2.6; P=0.08) de folículos maduros.

Otra observación que tuvimos fue que había folículos terciarios pequeños, por lo que agrupamos a los folículos secundarios (maduros e inmaduros) con los folículos terciarios; sin embargo, no encontramos diferencias en porcentaje (K=4.7, P=0.18), área (K=2.4, P=0.4) (figura 6). En esta agrupación hicimos una distribución por tamaños, en donde pudimos observar que los folículos de los animales tratados con MMI tienen menor tamaño que los controles. Este menor tamaño permanece en los animales de los grupos tratados con yodo (MMI+I₂ y I₂) (figura 7). Cuando agrupamos a los folículos en tamaños menores y mayores de 200 μ m, encontramos que efectivamente los folículos de hembras MMI, MMI+I₂ y I₂ son menores que las controles (Figura 7).

Tabla 1. Características morfométricas y análisis estadístico de folículos ováricos.

		Ctrl	MMI	MMI+I2	I2	Estadística
Primordiales	% folículos	79.0 ± 2.7	75.0 ± 2.4	70.1 ± 3.7	79.5 ± 3.4	F=1.9; P=0.16
	Promedio área	478.5 ± 31.5	485.5 ± 52.1	612.8 ± 42.1	568.3 ± 27.5	F=2.7; P=0.07
	Promedio diámetro	24.3 ± 0.83	24.3 ± 1.4	27.1 ± 1.3	26.6 ± 0.66	F=1.7; P=0.18
Primarios	% folículos	14.7 ± 1.3	13.4 ± 1.1	19.6 ± 2.7	13.5 ± 2.6	F=1.9; P=0.14
	Promedio área	2064.1 ± 265.3	1974.9 ± 349.4	1623.6 ± 151.8	1935.1 ± 193.7	K=1.4; P=0.70
	Promedio diámetro	48.2 ± 2.6	45.9 ± 3.3	44.0 ± 1.8	46.8 ± 2.2	F=0.46; P=0.70
Secundarios	% folículos	4.9 ± 1.3	9.4 ± 1.8	7.9 ± 1.6	6.2 ± 2.2	K=3.2; P=0.35
	Promedio área	12965.0 ± 1564.0	15876.7 ± 1903.5	13566.8 ± 1633.5	12608.5 ± 961.7	F=0.87; P=0.46
	Promedio diámetro	118.6 ± 8.9	126.2 ± 6.3	119.4 ± 3.5	123.3 ± 7.4	K=2.16; P=0.53
	Rango de diámetro	In 40.3-191.4	In 39.7-182.4	In 59.2-242.7	In 52.0-200.7	
		Ma 154.6-245.0	Ma 134.6-389.5	Ma 54.7-268.0	Ma 108.3-195.6	
Terciarios	% folículos	0.98 ± 0.62(3)	1.6 ± 0.54 (5)	0.95 ± 0.44 (3)	0.70 ± 0.39 (5)	K=1.8; P=0.59
	Promedio área	292650.7 ± 69596.4	518143.9 ± 375527.3	170220.0 ± 8177.4	127263.1 ± 36191.9	K=4.8; P=0.18
	Promedio diámetro	570.5 ± 55.2	682.7 ± 198.4	413.3 ± 98.3	386.4 ± 55.0	K=4.1; P=0.24
	Rango de diámetro	277.6-915.7	313.9-1433.6	153.2-842.2	253.2-537.2	
Graaf	% folículos	0.24 ± 0.24 (1)	0.41 ± 0.28 (2)	1.2 ± 0.76 (3)	0.0 ± 0.0 (0)	No aplica
	Promedio área	1450032.7	1325430.2 ± 167751.9	911894.3 ± 214069.4	0.0 ± 0.0	No aplica
	Promedio diámetro	1358.4	1305.4 ± 48.2	1052.6 ± 124.8	0.0 ± 0.0	No aplica

Tabla 1. El análisis estadístico utilizado para datos paramétricos fue ANOVA, mientras que para datos no paramétricos utilizamos Kruskal Wallis. Se evaluaron las características morfométricas de folículos ováricos de conejas en condiciones controles (Ctrl; n=6, número total de folículos medidos: 670 folículos/grupo, mínimo 74, máximo 165 folículos/animal); hipotiroides (MMI; n=6, número total de folículos medidos 705 folículos/grupo), mínimo 84, máximo 178 folículos/animal); hipotiroides tratada con yodo molecular (MMI+I₂; n=6, número total de folículos medidos: 825 folículos/grupo, mínimo 72, máximo 262 folículos/animal); y controles tratados con yodo (I₂; n=6, número total de folículos medidos: 542 folículos/grupo, mínimo 39, máximo 134 folículos/animal). Los folículos secundarios a su vez se dividieron en inmaduros (In) y maduros (Ma). Se usaron 3 cortes a diferente distancia por animal. Así mismo, los folículos terciarios y de Graaf fueron escasos, el número de folículos está representado en paréntesis en el apartado de % folículos, por ello los datos no fueron suficientes para el análisis estadístico.

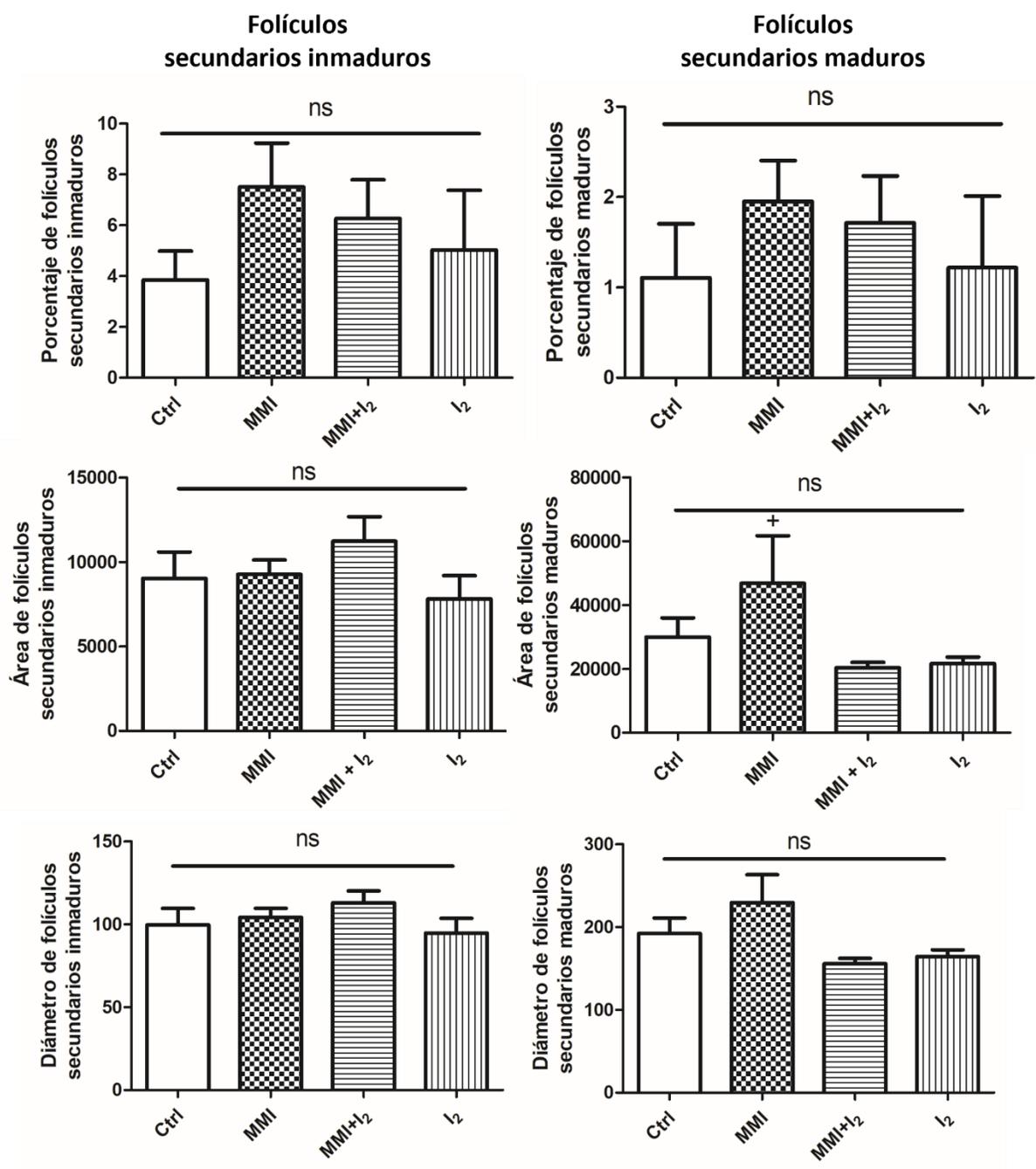


Figura 5. Porcentaje, área (μm^2) y diámetro (μm) de folículos ováricos secundarios (inmaduros y maduros) de conejas en condiciones controles (Ctrl; n=6), hipotiroides (MMI; n=6), hipotiroides tratada con yodo molecular (MMI+I₂; n=6) y controles tratados con yodo (I₂; n=6), Análisis estadístico Kruskal Wallis, prueba post hoc de Dunn's, resultados estadístico no significativos += K=7.1; P=0.06.

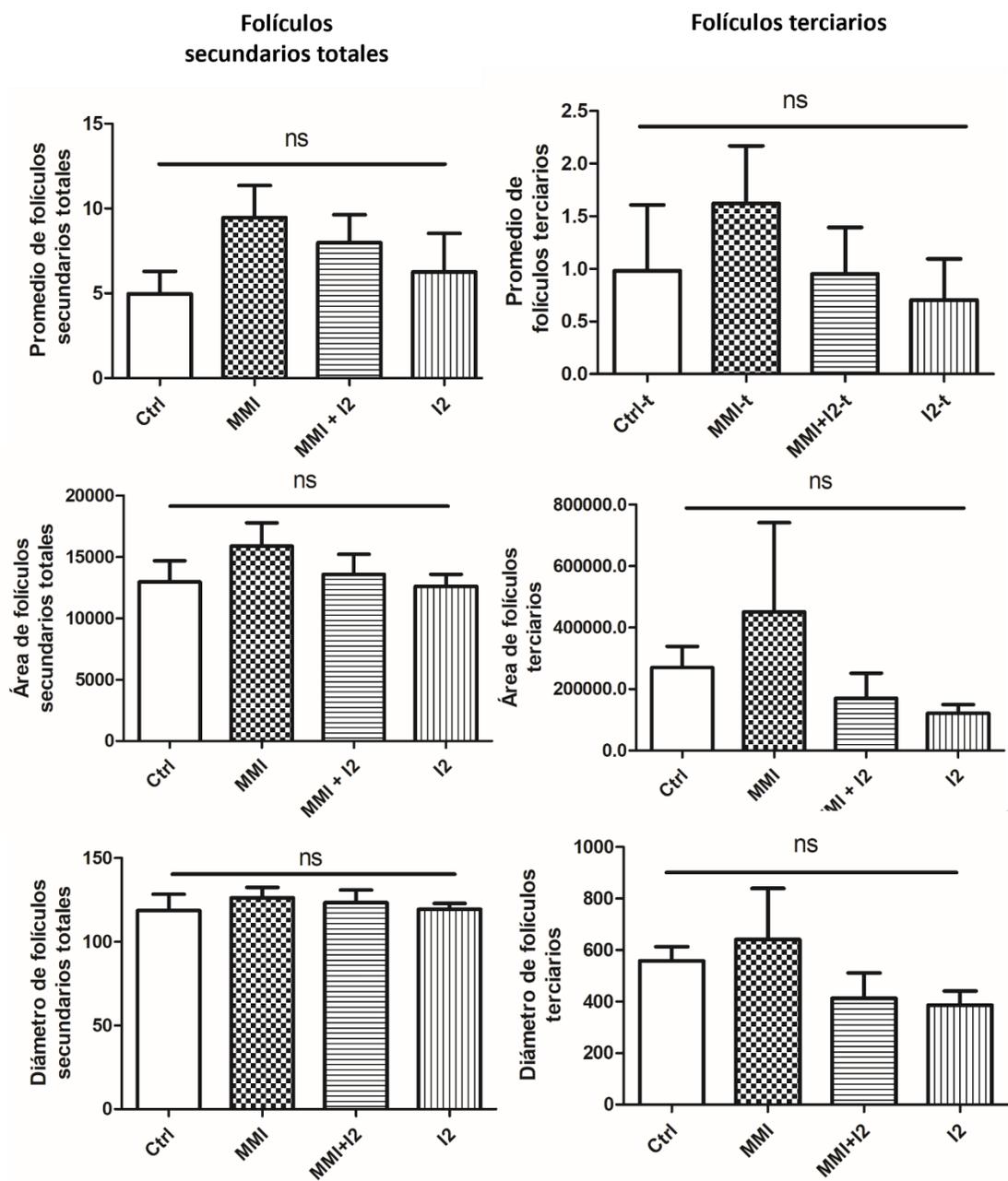


Figura 6. Porcentaje, área (μm^2) y diámetro (μm) de folículos ováricos secundarios totales y terciarios de conejas en condiciones controles (Ctrl; n=6), hipotiroideas (MMI; n=6), hipotiroidea tratada con yodo molecular (MMI+I₂; n=6) y controles tratados con yodo (I₂; n=6).

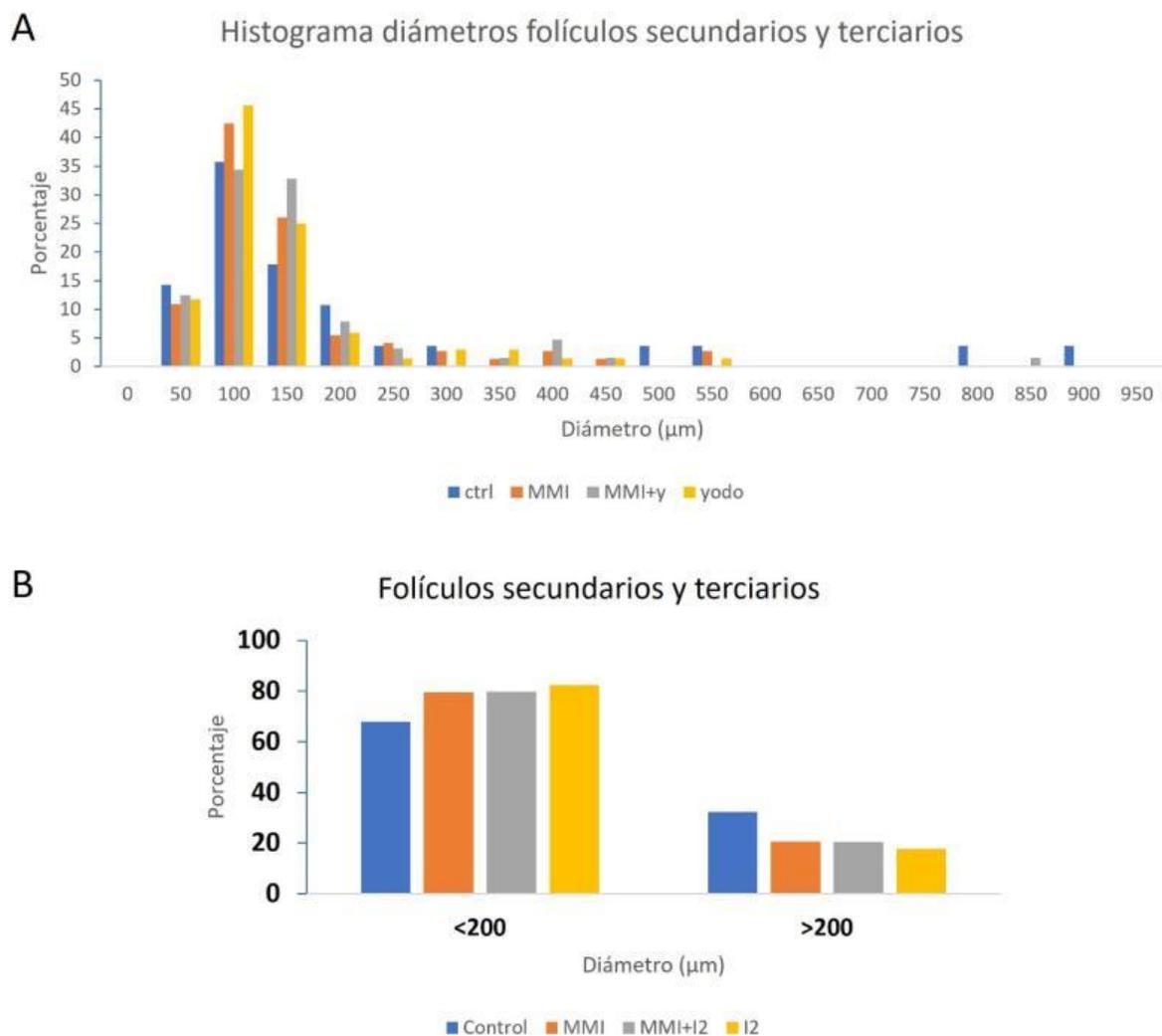


Figura 7. Histograma de folículos secundarios y terciarios considerando el diámetro (μm) de conejas controles (Ctrl; n=6), hipotiroideas (MMI; n=6), hipotiroidea tratada con yodo molecular (MMI+I₂; n=6) y controles tratados con yodo (I₂; n=6). A. Histograma general y B histograma agrupando menores y mayores de 200 μm .

7.2 Yodo y atresia folicular

Para la clasificación y cuantificación de folículos atrésicos por grupo experimental, se utilizaron tejidos teñidos a través de la técnica de Masson. El análisis estadístico no reflejó diferencias entre los grupos: atresia quística (K=2.4; P=0.4), obliterativa (K=2.2; P=0.5), infiltrativa (K=6.6; P=0.08) y residual (K=5.2; P=0.1) (Figura 8);

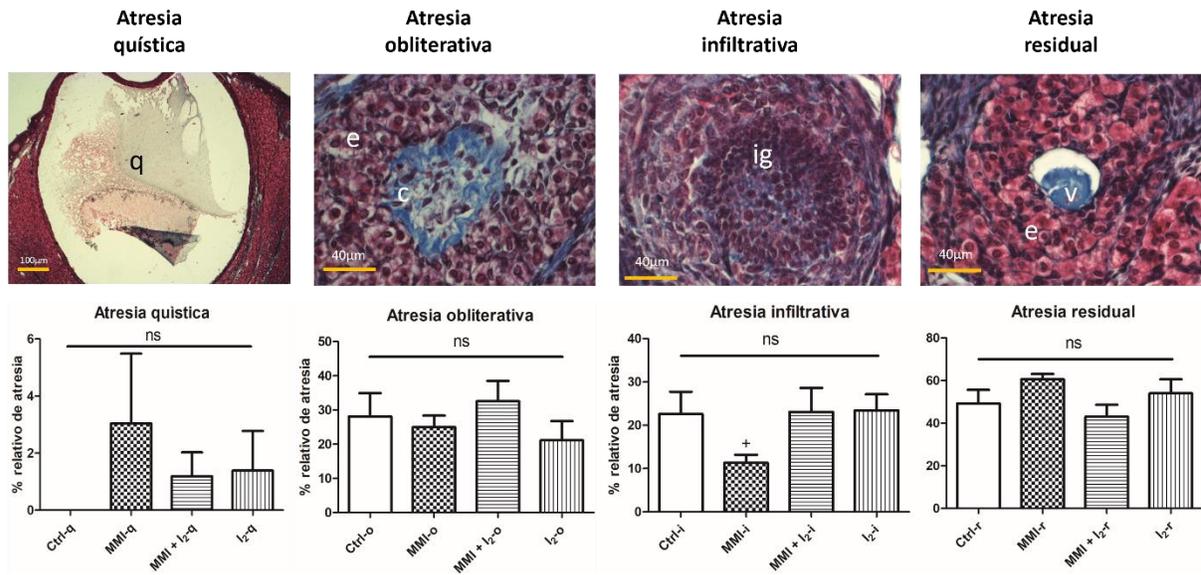


Figura 8. Microfotografías representativas y cuantificación de folículos con atresia quística (q), obliterativa (o), infiltrativa (i) y residual (r) en ovarios de conejas en condiciones controles (Ctrl; n=6), hipotiroideas (MMI; n=6), hipotiroidea tratada con yodo molecular (MMI+I₂; n=6) y controles tratados con yodo (I₂; n=6), += K=2.2; P=0.5, q: quiste ovárico, e: estroma ovárico, ig: infiltración de células de la granulosa y v: vacuolización.

7.3 Yodo e inflamación

El grupo tratado con metimazol, metimazol con yodo y yodo solo tuvieron un mayor número de células inmunes en el estroma en comparación con el grupo control. Además, el tratamiento con yodo solo presentó un desarreglo importante del estroma periférico con invaginaciones del epitelio (Figura 9).

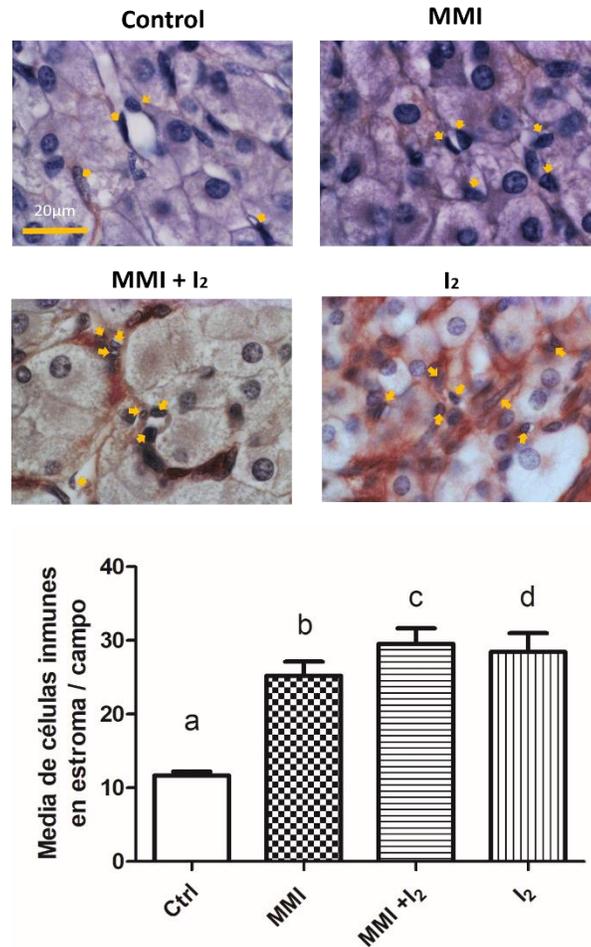


Figura 9. Microfotografías representativas y cuantificación de células inmunes en el estroma de ovarios de conejas en condiciones controles (Ctrl; n=6), hipotiroideas (MMI; n=6), hipotiroidea tratada con yodo molecular (MMI+I₂; n=6) y controles tratados con yodo (I₂; n=6). Las células inmunes se identificaron por tener cromatina condensada teñida con hematoxilina de Meyer y se localizaron en vasos sanguíneos. El análisis estadístico de ANOVA y la prueba post hoc Bonferroni, encontraron diferencias significativas entre los grupos MMI, MMI+I₂ y I₂, respecto al grupo control (b, c, d, p>0.001).

Además de una mayor infiltración de células inmunes, el grupo tratado con metimazol, metimazol más yodo y yodo mostraron una mayor expresión de TNF α en la corteza y estroma

ovárico (Figura 10 y tabla 2). Los grupos tratados con yodo (MMI+I₂ y I₂) también presentaron mayor expresión de TNF α en el hilio (Figura 10 y tabla 2). La expresión de TNF- α en los folículos primordiales, primarios y secundarios permaneció constante entre los grupos experimentales (Figura 11 y tabla 3). En los folículos secundarios maduros y terciarios, la expresión de TNF- α fue mayor en los grupos tratados con metimazol, metimazol más yodo y yodo solo vs. el grupo control (Figura 12 y tabla 4). La expresión de TNF α se vio incrementada en atresia infiltrativa para todos los grupos experimentales (Tabla 5), así mismo el grupo control yodo evidenció un aumento de expresión de TNF α atresia obliterativa y residual (Tabla 5).

Por su parte, no se observaron diferencias en la expresión de IL-6 en la corteza ovárica de los diferentes grupos. Sin embargo, el grupo hipotiroideo tratado con yodo tuvo una mayor expresión de IL-6 en el estroma y el hilio en comparación con los grupos control, hipotiroideo y control tratado con yodo (Figura 10 y tabla 2). En los folículos primordiales y primarios, la expresión de IL-6 permaneció constante entre los grupos experimentales (Figura 11 y tabla 3). Sin embargo, la expresión de IL-6 fue menor en el grupo hipotiroideo y control tratado con yodo (Figura 12 y tabla 4). Mientras que la expresión de IL-6 mostró el efecto contrario siendo menor en los grupos tratados (Figura 12 y tabla 4). No obstante, para los folículos terciarios la expresión de TNF α e IL-6 se vio incrementada en los grupos tratados con yodo y para el grupo hipotiroideo respecto al grupo control (Figura 12 y tabla 4) y solo para los grupos tratados con yodo se observó un incremento en la expresión de IL-6.

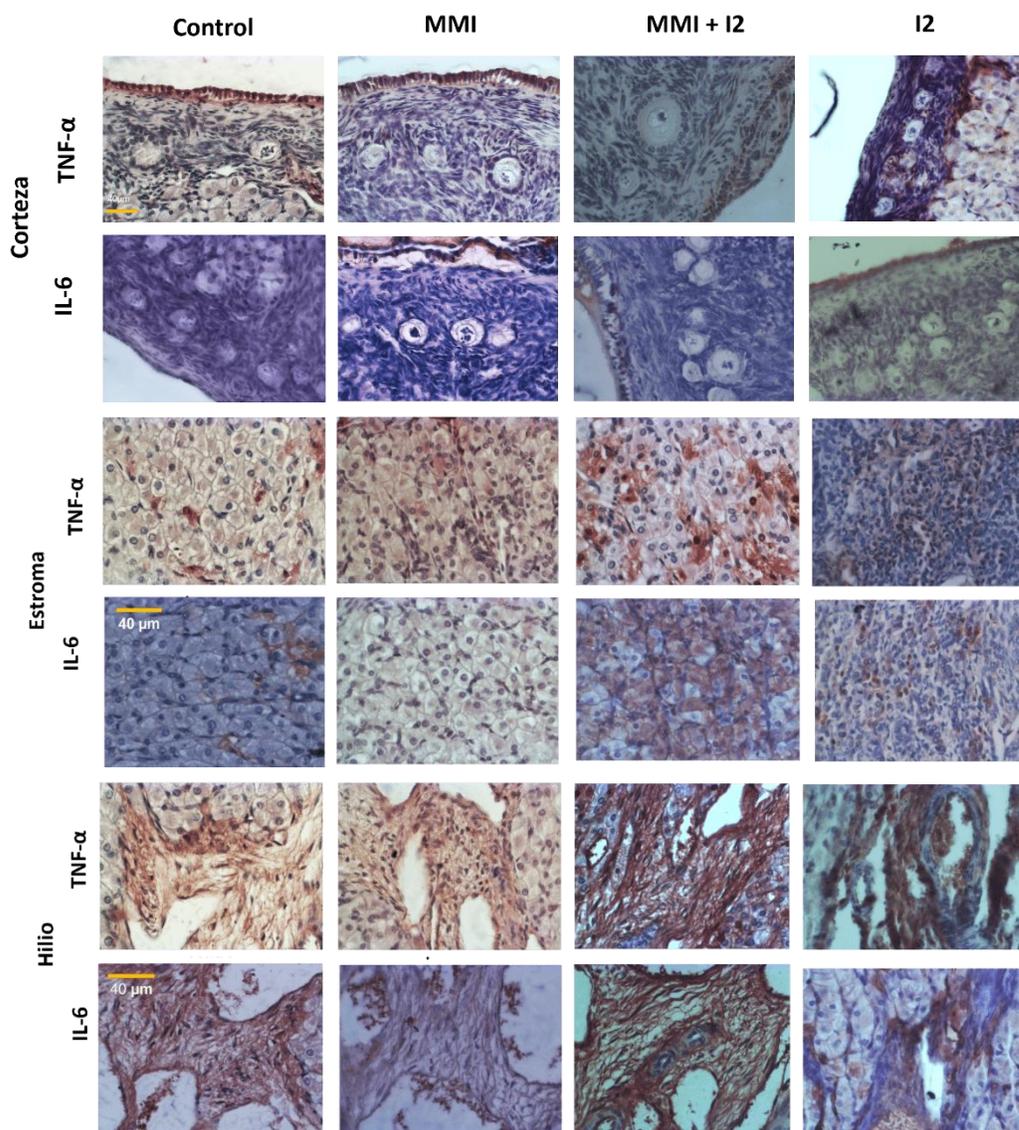


Figura 10. Microfotografías representativas de la expresión de TNF α e IL6 en corteza, estroma e hilio de ovarios de conejas en condiciones controles (Ctrl; n=6), hipotiroideas (MMI; n=6), hipotiroidea tratada con yodo molecular (MMI+I₂; n=6) y controles tratados con yodo (I₂; n=6). Escala= 40 μ m.

Corteza	Ctrl	MMI	MMI + I2	I2
TNF- α	/	+	+	++
IL-6	+	+	+	+
Estroma				
TNF- α	+	++	+++	++
IL-6	++	++	+++	++
Hilio				
TNF- α	+	+	+++	+++
IL-6	++	+	+++	++

Tabla 2. Semicuantificación de la expresión de TNF α e IL6 en corteza, estroma e hilio de ovarios de conejas en condiciones controles (Ctrl; n=6), hipotiroideas (MMI; n=6), hipotiroidea tratada con yodo molecular (MMI+I₂; n=6) y controles tratados con yodo (I₂; n=6).

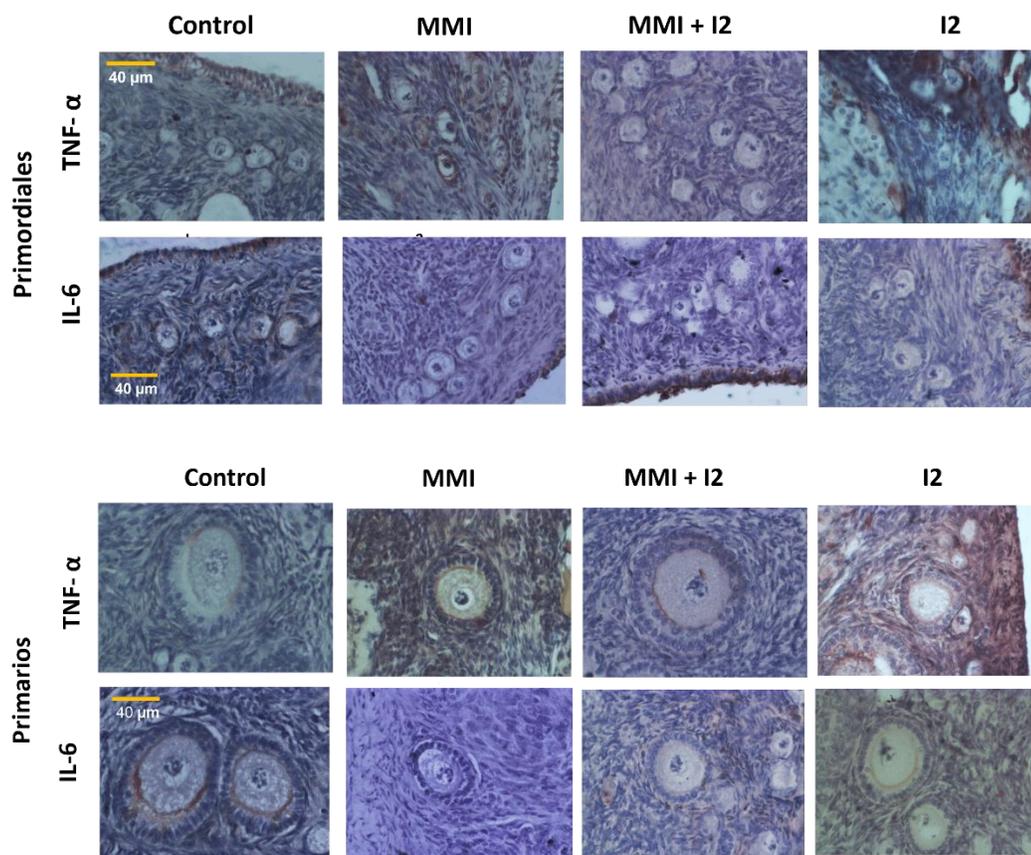


Figura 11. Microfotografías representativas de la expresión de TNF α e IL-6 en folículos primordiales y primarios de ovarios de conejas en condiciones controles (Ctrl; n=6), hipotiroides (MMI; n=6), hipotiroides tratada con yodo molecular (MMI+I₂; n=6) y controles tratados con yodo (I₂; n=6). Escala= 40 μ m.

	Ctrl	MMI	MMI + I ₂	I ₂
Folículos primordiales				
TNF-a	/	+	/	+
IL-6	/	/	/	/
Folículos primarios				
TNF-a	+	+	+	+
IL-6	+	+	+	+

Tabla 3. Semicuantificación de la expresión de TNF α e IL6 en folículos primordiales y primarios en ovarios de conejas en condiciones controles (Ctrl; n=6), hipotiroides (MMI; n=6), hipotiroides tratada con yodo molecular (MMI+I₂; n=6) y controles tratados con yodo (I₂; n=6).

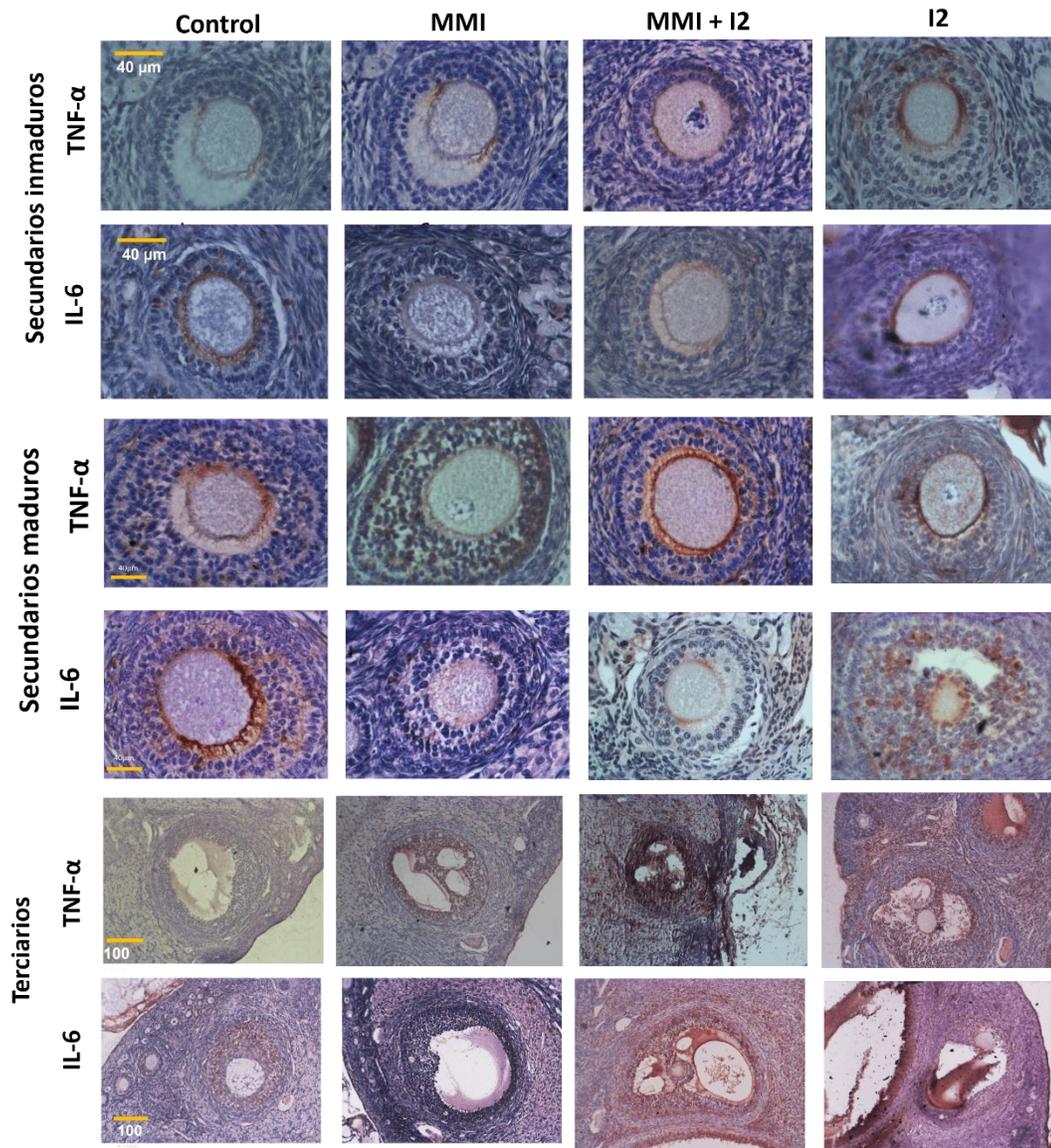


Figura 12. Microfotografías representativas de la expresión de TNF α e IL6 en folículos secundarios y terciarios de ovarios de conejas en condiciones controles (Ctrl; n=6), hipotiroideas (MMI; n=6), hipotiroidea tratada con yodo molecular (MMI+I₂; n=6) y controles tratados con yodo (I₂; n=6). Escalas= 40 y 100 μ m.

	Ctrl	MMI	MMI + I2	I2
Secundarios inmaduros				
TNF- α	+	+	+	+
IL-6	++	+	++	+
Secundarios maduros				
TNF- α	+	++	++	++
IL-6	++	+	+	+
Terciarios				
TNF- α	+	++	+++	+++
IL-6	++	++	+++	+++

Tabla 4. Semicuantificación de la expresión de TNF α e IL6 en folículos secundarios y terciarios en ovarios de conejas en condiciones controles (Ctrl; n=6), hipotiroideas (MMI; n=6), hipotiroidea tratada con yodo molecular (MMI+I₂; n=6) y controles tratados con yodo (I₂; n=6).

Atresia quística	Ctrl	MMI	MMI + I2	I2
TNF-a	/	+	/	+
IL-6	/	+	+	+

Atresia obliterativa	Ctrl	MMI	MMI + I2	I2
TNF-a	+	+	+	++
IL-6	+	+	+	+

Atresia residual	Ctrl	MMI	MMI + I2	I2
TNF-a	+	+	+	++
IL-6	/	+	+	+

Atresia infiltrativa	Ctrl	MMI	MMI + I2	I2
TNF-a	+	++	++	++
IL-6	+	+	++	++

Atresia residual	Ctrl	MMI	MMI + I2	I2
TNF-a	+	+	+	++
IL-6	/	+	+	+

Tabla 5. Semicuantificación de la expresión de TNF α e IL6 en folículos atrésicos en ovarios de conejas en condiciones controles (Ctrl; n=6), hipotiroideas (MMI; n=6), hipotiroidea tratada con yodo molecular (MMI+I₂; n=6) y controles tratados con yodo (I₂; n=6). Se cuantificaron 10 folículos por cada grupo experimental

8. Discusión

La maduración folicular está regulada por diversos factores intraováricos, gonadotrópicos, metabólicos e inflamatorios (McGee y Hsueh, 2000; Jana et al., 2007; Roberts et al., 2013; Jo et al., 2020). La alteración de dichos factores, como sucede en el hipotiroidismo, puede modificar el crecimiento de los folículos evidenciando un cambio de diámetro y expresión de citocinas proinflamatorias. Una posible alternativa que contrarreste los efectos nocivos del hipotiroidismo podría ser la suplementación con yodo molecular, ya que éste ha mostrado tener acciones antioxidativas (Nuñez-Anita et al., 2009) y anti-inflamatorias (Krela-Kaźmierczak et al., 2021). Previamente se ha descrito que el hipotiroidismo reduce el tamaño de los folículos, limitando la maduración folicular en conejas (Rodríguez-Castelán et al., 2017). En el presente trabajo, también encontramos un menor tamaño folicular en los animales hipotiroideos o tratados con yodo. Este tamaño no solo no fue recuperado por el tratamiento con yodo, sino que además el yodo "solo" redujo el tamaño folicular. En nuestros análisis pudimos observar que, a diferencia del trabajo de conejas (Rodríguez-Castelán et al., 2017), los folículos secundarios y terciarios tienden a tener un tamaño un poco mayor lo que nos obligó a recorrer el punto de cohorte de 100 a 200 μm . Ello podría estar relacionado con las condiciones metabólicas de las hembras (peso corporal, nivel de glucosa, niveles de lípidos) y la edad de las hembras. Otro factor que podría influir es el tiempo de fijación de los tejidos entre ambos estudios. El análisis de estas características deberá ser realizado con detalle para identificar los factores que han influido en las diferencias entre estudios. En apoyo a nuestros resultados, se ha reportado la disminución del tamaño de quistes ováricos posterior a una irrigación de povidona yodada en ratas (Atilgan et al., 2019), lo que explicaría porqué el yodo "solo" reduce el tamaño de los folículos secundarios y terciarios.

Como ya mencionamos en la introducción, la presencia de células inmunes en el ovario y la producción de citocinas es importante para la maduración folicular (Field et al., 2014). Dentro de las células que se infiltran al ovario se encuentran leucocitos, monocitos, linfocitos T, macrófagos y neutrófilos en la capa de la teca durante la fase folicular, mientras que en la fase ovulatoria se incrementa la presencia de macrófagos y neutrófilos (Wu et al., 2007). De esta manera, las células inmunes dentro del ovario varían con la fase del ciclo menstrual o estral, ya

que es la propia LH quien a través de la regulación de prostaglandinas estimula la infiltración de células inmunes en el ovario (Park et al., 2022). Las células inmunes varían en número cerca de cada tipo de folículo siendo mayor en los folículos maduros y el cuerpo lúteo (Kinnear et al., 2020). Aunque un exceso de células inmunes también puede ser perjudicial y dañar a los folículos (Park et al., 2022) y producir fibrosis ovárica (de Araújo et al., 2018). En el presente estudio cuantificamos la infiltración de células inmunes (polimorfonucleares y mononucleares) encontrando que tanto hipotiroidismo como el yodo aumentan su presencia y permanecen en conjunto (grupo MMI + I₂). El tratamiento con yodo en el animal hipotiroideo no reduce la infiltración de células inmunes. A este respecto, el hipotiroidismo es conocido por promover la infiltración de células inmunes en diversos órganos como el páncreas (Rodríguez-Castelán et al., 2015), hígado (Rodríguez-Castelán et al., 2019) y útero (Rodríguez-Castelán et al., 2019). Las células inmunes presentes en el ovario secretan citocinas como TNF- α (Fragoso et al., 2014) e IL-6 (Jang et al., 2015). El TNF- α se expresa en células de la granulosa, de la teca y cuerpo lúteo (Sakumoto y Okuda, 2004). Mientras que la IL-6 ha sido reportada en las células de la granulosa y el cúmulo (Jang et al., 2015). Si bien el TNF- α está relacionado con la supervivencia celular y apoptosis necesarios para los procesos de maduración folicular, ovulación y formación del cuerpo lúteo, un exceso de esta citocina disminuye el número de folículos favoreciendo la falla ovárica (Park et al., 2022, Zhou et al., 2017). Por su parte, la IL-6 participa en la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células de la granulosa que forman al cúmulo (Huang et al., 2022; Jang et al., 2015), estos datos podrían explicar la disminución de expresión de IL-6 y el mayor número de folículos secundarios maduros e inmaduros detenidos en la maduración del grupo hipotiroideo. Por el contrario, el exceso de citocinas en estadios de mayor maduración podría inducir fibrosis ovárica al estimular la producción de colágeno y fibroblastos (Umehara et al., 2022).

De acuerdo con nuestros resultados, de manera general, el hipotiroidismo y el yodo aumentaron la expresión de TNF- α e IL6 en folículos terciarios, así como en el estroma e hilio. Mientras que los folículos inmaduros (primordiales, primarios y secundarios inmaduros) no mostraron cambios. Estos resultados son opuestos a lo esperado, ya que el yodo ha mostrado acciones anti-oxidativas y anti-inflamatorias (Lee et al., 2022). Es posible que la dosis utilizada

en el presente estudio haya sido dañina para la función ovárica y no nos haya permitido evidenciar su posible efecto benéfico. Cabe mencionar que esta misma dosis ya fue utilizada en conejas para contrarrestar el efecto dañino del hipotiroidismo en el páncreas (Rodríguez-Castelán et al., 2023), lo que sugiere que el ovario es más sensible a la concentración de yodo, quizá debido a que dicho órgano es el segundo en su capacidad de absorción de yodo (Ślebodziński, 2005). Otra posible explicación es que el páncreas es un órgano deficiente en combatir el estrés oxidativo (Drews et al., 2010), mientras que, el ovario es rico en enzimas antioxidantes; de manera que, en el ovario, el yodo potencializaría al sistema propio del tejido en el combate antiestrés oxidativo, llevándolo a un estado pobre de radicales libres útiles en la maduración folicular (Yan et al., 2022). Otra posibilidad, es que el ovario almacena colesterol y el contenido de éste es aumentado por el hipotiroidismo (Rodríguez-Castelán et al., 2018), al mismo tiempo el yodo favorece la lipoperoxidación (Karbownik-Lewińska et al., 2022) lo que podría generar más radicales libres en este órgano. Existiendo así una suma de efectos oxidantes entre el hipotiroidismo y el yodo.

Respecto al efecto del hipotiroidismo y el yodo en la expresión de TNF- α e IL6 sobre los diferentes tipos de folículos, siendo más evidente en los folículos de mayor desarrollo, podemos proponer una hipótesis de mayor oxidación en estos folículos. Los folículos maduros requieren de un mayor metabolismo (Warzych y Lipinska, 2020) y podrían generar un mayor estrés oxidativo, lo que se sinergia con el estrés generado por el hipotiroidismo (Karbownik-Lewińska et al., 2022) y el yodo (Saha et al., 2019). El exceso de yodo incrementa el estrés oxidativo en linfocitos y favorece la actividad de citocinas (Saha et al., 2019), debido a que la infiltración de células inmunes es mayor en estadios de mayor maduración (Kinnear et al., 2020); también se ha reportado que el incremento de TNF α aumenta la transcripción de IL-6 (Rose-John, 2020), estos datos podrían justificar el incremento de expresión de TNF α e IL-6 en folículos terciarios. Además, los folículos maduros, que son dependientes de gonadotropinas, se localizan cerca del estroma ovárico, lo que los hace más sensible al estrés oxidativo (Armstrong y Webb, 1997).

En el ovario, la T3 y el estradiol en las células de la granulosa son considerados anti apoptóticos y antioxidantes (Di Paolo et al., 2020). No obstante, estas propiedades protectoras también se

ven disminuidas en el hipotiroidismo con una baja expresión de aromatasa (Rodríguez-Castelán, et al., 2017).

Aunque no existieron diferencias significativas en los tipos de atresia, la estadística demuestra una tendencia a disminuir la atresia infiltrativa en el grupo hipotiroideo ($K=6.6$; $P=0.08$), directamente relacionado con la predisposición a un mayor número y área de folículos secundarios maduros en el grupo hipotiroideo ($K=7.1$; $P=0.06$), debido a que este tipo de atresia es característico de los folículos con varias capas de la granulosa (Meng et al., 2021), podemos proponer una hipótesis de diferenciación y maduración retrasada debido a que el proceso de atresia comienza en células de la granulosa (Balazi et al., 2014; Logothetopoulos et al., 1995; Matsuda et al., 2012), correlacionado con el incremento de expresión de $TNF\alpha$ (Cui et al., 2011) y la disminución de factores de supervivencia como IL-6, E2, T3 (Matsuda et al., 2012). Por otra parte, se correlaciona el incremento de la expresión de $TNF\alpha$ en atresia infiltrativa derivado de los folículos secundarios maduros en todos los grupos experimentales; también la respuesta al yodo en atresia infiltrativa, sugiriendo que el yodo participa en la regulación de la atresia a través de la expresión de IL-6.

9. Conclusiones

El MMI reduce el tamaño de los folículos secundarios y terciarios, y el tratamiento con yodo no lo evita. Al contrario, el yodo solo reduce también su tamaño.

El MMI aumenta la infiltración de células inmunes al estroma ovárico y no es mejorado con el tratamiento de yodo.

Las citocinas IL-6 y TNF- α participan en la regulación de la maduración folicular, sugiriendo una actividad protectora y antiinflamatoria por IL-6 y pro- inflamatoria por TNF α , dicho efecto se ve potencializado por el yodo en estadios de mayor maduración.

11. Perspectivas de investigación

Analizar el estado antioxidante del ovario en los grupos tratados con yodo podría contribuir a dilucidar como responden las enzimas antioxidantes ante la presencia del yodo molecular.

La identificación y caracterización de células inmunes podría definir la participación y modulación en la maduración folicular.

Evaluar la presencia de fibrosis, resultado de la inflamación en el ovario podría generar una perspectiva de restricción mecánica de la maduración folicular.

Analizar la participación de metaloproteasas contribuye a definir las vías pro/antiinflamatorias de citocinas pleiotrópicas.

11. Referencias

- Abdollahifar, M. A., Azad, N., Sajadi, E., Mofarahe, Z. S., Zare, F., Moradi, A., Rezaee, F., Gholamin, M., & Abdi, S. (2019). Vitamin C restores ovarian follicular reservation in a mouse model of aging. *Anatomy & Cell Biology*, 52(2), 196–203. <https://doi.org/10.5115/ACB.2019.52.2.196>
- Aceves, C., Anguiano, B., & Delgado, G. (2013). The Extrathyronine Actions of Iodine as Antioxidant, Apoptotic, and Differentiation Factor in Various Tissues. *Thyroid*, 23(8), 938. <https://doi.org/10.1089/THY.2012.0579>
- Agarwal, A., Gupta, S., & Sharma, R. (2005). Oxidative stress and its implications in female infertility – a clinician’s perspective. *Reproductive BioMedicine Online*, 11(5), 641–650. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61174-1](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61174-1)
- Al-Alem, L., Puttabyatappa, M., Rosewell, K., Brännström, M., Akin, J., Boldt, J., Muse, K., & Curry, T. E. (2015). Chemokine Ligand 20: A Signal for Leukocyte Recruitment During Human Ovulation? *Endocrinology*, 156(9), 3358–3369. <https://doi.org/10.1210/EN.2014-1874>
- Alfaro, Y., Delgado, G., Cárabez, A., Anguiano, B., & Aceves, C. (2013). Iodine and doxorubicin, a good combination for mammary cancer treatment: antineoplastic adjuvancy, chemoresistance inhibition, and cardioprotection. *Molecular Cancer*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-45>
- Arbez-Evangelista, C., Arroyo-Xochihua, O., Ortega-Ibarra, I. H., Ortega-Ibarra, E., León-Ramírez, Y. M. De, Cuevas-Romero, E., & Arroyo-Helguera, O. (2024). Excess Iodine Consumption Induces Oxidative Stress and Pancreatic Damage Independently of Chemical Form in Male Wistar Rats: Participation of PPAR- γ and C/EBP- β . *Biology* 2024, Vol. 13, Page 466, 13(7), 466. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY13070466>
- Arias Álvarez, M., García-García, R. M., García Rebollar, P., & Lorenzo González, P. L. (2007). Desarrollo folicular en la coneja. *ITEA, Información Técnica Económica Agraria: Revista de La Asociación Interprofesional Para El Desarrollo Agrario (AIDA)*, ISSN 1699-6887, Nº. 4, 2007, Págs. 173-185, 4, 173–185. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2478943>
- Armstrong, D. G., & Webb, R. (1997). Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Reviews of Reproduction*, 2(3), 139–146. <https://doi.org/10.1530/ROR.0.0020139>
- Arroyo-Helguera, O., Anguiano, B., Delgado, G., & Aceves, C. (2006). Uptake and antiproliferative effect of molecular iodine in the MCF-7 breast cancer cell line. *Endocrine-Related Cancer*, 13(4), 1147–1158. <https://doi.org/10.1677/ERC.1.01250>
- Atilgan, R., Pala, Ş., & Kuloğlu, T. (2019). Investigation of treatment efficacy of 10% povidone–iodine sclerotherapy on ovarian cyst diameter: an experimental study. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 49(3), 795–801. <https://doi.org/10.3906/sag-1810-27>
- Balazi, A., Sirotkin, A. V., Pivko, J., & Chrenek, P. (2014). Effect of oxytocin, IBMX and dbcAMP on rabbit ovarian follicles. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 43(5), 379–385. <https://doi.org/10.1111/AHE.12088>

- Baljet, B., & Drukker, J. (1979). The extrinsic innervation of the abdominal organs in the female rat. *Acta Anatomica*, *104*(3), 243–267. <https://doi.org/10.1159/000145073>
- Bianco, A. C., & Kim, B. W. (2006). Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *Journal of Clinical Investigation*, *116*(10), 2571. <https://doi.org/10.1172/JCI29812>
- Bradbury, R. A., Christie-David, D., Smith, H. C., Byth, K., & Eastman, C. J. (2022). Prior iodine exposure and impact on thyroid function during controlled ovarian hyperstimulation: A prospective study. *The Australian & New Zealand Journal of Obstetrics & Gynaecology*, *62*(1), 133–139. <https://doi.org/10.1111/AJO.13419>
- Calcaterra, V., Mameli, C., Rossi, V., Massini, G., Gambino, M., Baldassarre, P., & Zuccotti, G. (2022). The Iodine Rush: Over- or Under-Iodination Risk in the Prophylactic Use of Iodine for Thyroid Blocking in the Event of a Nuclear Disaster. *Frontiers in Endocrinology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2022.901620>
- Candelaria, J. I., Rabaglino, M. B., & Denicol, A. C. (2020). Ovarian preantral follicles are responsive to FSH as early as the primary stage of development. *The Journal of Endocrinology*, *247*(2), 153–168. <https://doi.org/10.1530/JOE-20-0126>
- Cecconi, S., Rucci, N., Scaldaferrri, M. L., Masciulli, M. P., Rossi, G., Moretti, C., D'Armiento, M., & Ulisse, S. (1999). Thyroid hormone effects on mouse oocyte maturation and granulosa cell aromatase activity. *Endocrinology*, *140*(4), 1783–1788. <https://doi.org/10.1210/ENDO.140.4.6635>
- Chang, C. W., Sung, Y. W., Hsueh, Y. W., Chen, Y. Y., Ho, M., Hsu, H. C., Yang, T. C., Lin, W. C., & Chang, H. M. (2022). Growth hormone in fertility and infertility: Mechanisms of action and clinical applications. *Frontiers in Endocrinology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2022.1040503>
- Clarke, H. J. (2018). REGULATION OF GERM CELL DEVELOPMENT BY INTERCELLULAR SIGNALING IN THE MAMMALIAN OVARIAN FOLLICLE. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology*, *7*(1). <https://doi.org/10.1002/WDEV.294>
- Colella, M., Cuomo, D., Giacco, A., Mallardo, M., de Felice, M., & Ambrosino, C. (2020). Thyroid Hormones and Functional Ovarian Reserve: Systemic vs. Peripheral Dysfunctions. *Journal of Clinical Medicine* 2020, Vol. 9, Page 1679, *9*(6), 1679. <https://doi.org/10.3390/JCM9061679>
- Costermans, N. G. J., Teerds, K. J., Kemp, B., Keijer, J., & Soede, N. M. (2023). Physiological and metabolic aspects of follicular developmental competence as affected by lactational body condition loss. *Molecular Reproduction and Development*, *90*(7), 491–502. <https://doi.org/10.1002/MRD.23628>
- Cui, L. L., Yang, G., Pan, J., & Zhang, C. (2011). Tumor necrosis factor α knockout increases fertility of mice. *Theriogenology*, *75*(5), 867–876. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2010.10.029>
- Dai, X., Lu, Y., Zhang, M., Miao, Y., Zhou, C., Cui, Z., & Xiong, B. (2017). Melatonin improves the fertilization ability of post-ovulatory aged mouse oocytes by stabilizing ovastacin and Juno to promote sperm binding and fusion. *Human Reproduction*, *32*(3), 598–606. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEW362>

- de Araújo, J. F. P., Podratz, P. L., Sena, G. C., Merlo, E., Freitas-Lima, L. C., Ayub, J. G. M., Pereira, A. F. Z., Santos-Silva, A. P., Miranda-Alves, L., Silva, I. v., & Graceli, J. B. (2018). The obesogen tributyltin induces abnormal ovarian adipogenesis in adult female rats. *Toxicology Letters*, 295, 99–114. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2018.06.1068>
- Derave, W., Lund, S., Holman, G. D., Wojtaszewski, J., Pedersen, O., & Richter, E. A. (1999). Contraction-stimulated muscle glucose transport and GLUT-4 surface content are dependent on glycogen content. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 277(6 40-6). <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1999.277.6.e1103>
- Di Paolo, V., Mangialardo, C., Zacà, C., Barberi, M., Sereni, E., Borini, A., Centanni, M., Coticchio, G., Verga-Falzacappa, C., & Canipari, R. (2020). Thyroid hormones T3 and T4 regulate human luteinized granulosa cells, counteracting apoptosis and promoting cell survival. *Journal of Endocrinological Investigation*, 43(6), 821–831. <https://doi.org/10.1007/S40618-019-01169-5>
- Dijkstra, G., De Rooij, D. G., De Jong, F. H., & Van Den Hurk, R. (1996). Effect of hypothyroidism on ovarian follicular development, granulosa cell proliferation and peripheral hormone levels in the prepubertal rat. *European Journal of Endocrinology*, 134(5), 649–654. <https://doi.org/10.1530/EJE.0.1340649>
- Dodson, W. C., & Schomberg, D. W. (1987). The effect of transforming growth factor-beta on follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, 120(2), 512–516. <https://doi.org/10.1210/ENDO-120-2-512>
- Drews, G., Krippeit-Drews, P., & Duifer, M. (2010). Oxidative stress and beta-cell dysfunction. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*, 460(4), 703–718. <https://doi.org/10.1007/S00424-010-0862-9>
- Field, S. L., Dasgupta, T., Cummings, M., & Orsi, N. M. (2014). Cytokines in ovarian folliculogenesis, oocyte maturation and luteinisation. *Molecular Reproduction and Development*, 81(4), 284–314. <https://doi.org/10.1002/MRD.22285>
- Flores-Opazo, M., McGee, S. L., & Hargreaves, M. (2020). Exercise and GLUT4. In *Exercise and Sport Sciences Reviews* (Vol. 48, Issue 3, pp. 110–118). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1249/JES.0000000000000224>
- Fragoso, J. M., Vargas Alarcón, G., Morales, S. J., Daniel, O., Hernández, R., & Bello, J. R. (2014). El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en las enfermedades autoinmunes (EA): biología molecular y genética ARTÍCULO DE REVISIÓN Correspondencia. In *Gac Med Mex* (Vol. 150).
- Furat Rencher, S., Kurnaz Ozbek, S., Eraldemlr, C., Sezer, Z., Kum, T., Ceylan, S., & Guzel, E. (2018). Effect of resveratrol and metformin on ovarian reserve and ultrastructure in PCOS: an experimental study. *Journal of Ovarian Research*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/S13048-018-0427-7>
- Gershon, E., & Dekel, N. (2020). Newly Identified Regulators of Ovarian Folliculogenesis and Ovulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 1–18. <https://doi.org/10.3390/IJMS21124565>

- González, F. (2015). Nutrient-Induced Inflammation in Polycystic Ovary Syndrome: Role in the Development of Metabolic Aberration and Ovarian Dysfunction. *Seminars in Reproductive Medicine*, 33(4), 276–286. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1554918>
- Hapon, M. B., Gamarra-Luques, C., & Jahn, G. A. (2010). Short term hypothyroidism affects ovarian function in the cycling rat. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 8. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-14>
- Hassanien, M. H., Hussein, L. A., Robinson, E. N., & Mercer, L. P. (2003). Human iodine requirements determined by the saturation kinetics model. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 14(5), 280–287. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(03\)00034-2](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(03)00034-2)
- Hingst, J. R., Bruhn, L., Hansen, M. B., Rosschou, M. F., Birk, J. B., Fentz, J., Foretz, M., Viollet, B., Sakamoto, K., Færgeman, N. J., Havelund, J. F., Parker, B. L., James, D. E., Kiens, B., Richter, E. A., Jensen, J., & Wojtaszewski, J. F. P. (2018). Exercise-induced molecular mechanisms promoting glycogen supercompensation in human skeletal muscle. *Molecular Metabolism*, 16, 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.07.001>
- Horiuchi, T., Mitoma, H., Harashima, S. I., Tsukamoto, H., & Shimoda, T. (2010). Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford, England)*, 49(7), 1215. <https://doi.org/10.1093/RHEUMATOLOGY/KEQ031>
- Hsieh, M., Zamah, A. M., & Conti, M. (2009). Epidermal growth factor-like growth factors in the follicular fluid: role in oocyte development and maturation. *Seminars in Reproductive Medicine*, 27(1), 52–61. <https://doi.org/10.1055/S-0028-1108010>
- Hsueh, A. J. W., Kawamura, K., Cheng, Y., & Fauser, B. C. J. M. (2015). Intraovarian Control of Early Folliculogenesis. *Endocrine Reviews*, 36(1), 1–24. <https://doi.org/10.1210/ER.2014-1020>
- Hu, K.-L., Chen, Z., Li, X., Cai, E., Yang, H., Chen, Y., Wang, C., Ju, L., Deng, W., & Mu, L. (2022). Advances in clinical applications of kisspeptin-GnRH pathway in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12958-022-00953-y>
- Huang, B., Lang, X., & Li, X. (2022). The role of IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway in cancers. *Frontiers in Oncology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FONC.2022.1023177>
- Idriss, H. T., & Naismith, J. H. (2000). TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microscopy Research and Technique*, 50(3), 184–195. [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20000801\)50:3<184::aid-jemt2>3.0.co;2-h](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20000801)50:3<184::aid-jemt2>3.0.co;2-h)
- Jana, B., Dzienis, A., Wojtkiewicz, J., Kaczmarek, M., & Majewski, M. (2007). Surgical denervation of porcine ovaries during the middle luteal phase of the oestrous cycle changes their morphology and steroidogenic activity. *Acta Veterinaria Hungarica*, 55(1), 107–122. <https://doi.org/10.1556/AVET.55.2007.1.11>
- Jang, Y. J., Park, J. il, Moon, W. J., Dam, P. T. M., Cho, M. K., & Chun, S. Y. (2015). Cumulus cell-expressed type I interferons induce cumulus expansion in mice. *Biology of Reproduction*, 92(1), 20–21. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.114.122770/2434006>

- Jiang, J. Y., Umezu, M., & Sato, E. (2000). Improvement of follicular development rather than gonadotrophin secretion by thyroxine treatment in infertile immature hypothyroid rdw rats. *Journal of Reproduction and Fertility*, *119*(2), 193–199. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.1190193>
- Jo, E., Jang, H. J., Yang, K. E., Jang, M. S., Huh, Y. H., Yoo, H. S., Park, J. S., Jang, I. S., & Park, S. J. (2020). Cordyceps militaris induces apoptosis in ovarian cancer cells through TNF- α /TNFR1-mediated inhibition of NF- κ B phosphorylation. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, *20*(1). <https://doi.org/10.1186/S12906-019-2780-5>
- Judge, A., & Dodd, M. S. (2020). Metabolism. In *Essays in Biochemistry* (Vol. 64, Issue 4, pp. 607–647). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/EBC20190041>
- Kang, S., Narazaki, M., Metwally, H., & Kishimoto, T. (2020). Historical overview of the interleukin-6 family cytokine. *The Journal of Experimental Medicine*, *217*(5). <https://doi.org/10.1084/JEM.20190347>
- Karownik-Lewińska, M., Stepniak, J., Iwan, P., & Lewiński, A. (2022). Iodine as a potential endocrine disruptor—a role of oxidative stress. *Endocrine*. <https://doi.org/10.1007/s12020-022-03107-7>
- Kassi, E., Pervanidou, P., Kaltsas, G., & Chrousos, G. (2011). Metabolic syndrome: Definitions and controversies. *BMC Medicine*, *9*. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-48>
- Kaushik, T., Mishra, R., Singh, R. K., & Bajpai, S. (2020). Role of connexins in female reproductive system and endometriosis. *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*, *49*(6). <https://doi.org/10.1016/J.JOGO.2020.101705>
- Kehoe, S., Jewgenow, K., Johnston, P. R., Mbedi, S., & Braun, B. C. (2021). Signalling pathways and mechanistic cues highlighted by transcriptomic analysis of primordial, primary, and secondary ovarian follicles in domestic cat. *Scientific Reports*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-021-82051-4>
- Kessler, J., & Hooge, D. (2007). Aqueous iodine equilibria in Mammalian iodination reactions. *Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association*, *17*(1), 19–24. <https://doi.org/10.1089/THY.2006.0243>
- Kinnear, H. M., Tomaszewski, C. E., Chang, F. L., Moravek, M. B., Xu, M., Padmanabhan, V., & Shikanov, A. (2020). The Ovarian Stroma as a New Frontier. *Reproduction (Cambridge, England)*, *160*(3), R25. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0501>
- Kiran, Z. (2021). Ovarian reserve. *Subfertility: Recent Advances in Management and Prevention*, 77–95. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-75945-8.00004-9>
- Knecht, M., Feng, P., & Catt, K. (1987). Bifunctional role of transforming growth factor-beta during granulosa cell development. *Endocrinology*, *120*(4), 1243–1249. <https://doi.org/10.1210/ENDO-120-4-1243>
- Krela-Kaźmierczak, I., Czarnywojtek, A., Skoracka, K., Rychter, A. M., Ratajczak, A. E., Szymczak-Tomczak, A., Ruchała, M., & Dobrowolska, A. (2021). Is There an Ideal Diet to Protect against Iodine Deficiency? *Nutrients*, *13*(2), 1–15. <https://doi.org/10.3390/NU13020513>

- Lebovitz, H. E. (2001). Insulin resistance: Definition and consequences. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, 109(SUPPL. 2). <https://doi.org/10.1055/s-2001-18576>
- Lee, E. B., Praveen Chakravarthi, V., Wolfe, M. W., & Karim Rumi, M. A. (2021). ER β regulation of gonadotropin responses during folliculogenesis. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 19). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms221910348>
- Lee, S. H., Choi, M. R., Chung, J., Choi, S. H., Park, S. K., & Kim, Y. M. (2022). Povidone iodine suppresses LPS-induced inflammation by inhibiting TLR4/MyD88 formation in airway epithelial cells. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-022-07803-2>
- Lei, Y., Yang, J., Li, H., Zhong, H., & Wan, Q. (2019). Changes in glucose-lipid metabolism, insulin resistance, and inflammatory factors in patients with autoimmune thyroid disease. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 33(7). <https://doi.org/10.1002/jcla.22929>
- Liang, H., Yang, X., Liu, C., Sun, Z., & Wang, X. (2018). Effect of NF- κ B signaling pathway on the expression of MIF, TNF- α , IL-6 in the regulation of intervertebral disc degeneration. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*, 18(4), 551–556. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30511959/>
- Lin, P., & Rui, R. (2010). Effects of follicular size and FSH on granulosa cell apoptosis and atresia in porcine antral follicles. *Molecular Reproduction and Development*, 77(8), 670–678. <https://doi.org/10.1002/mrd.21202>
- Liu, J., Han, Y., Tian, Y., Weng, X., Hu, X., Liu, W., Heng, D., Xu, K., Yang, Y., & Zhang, C. (2018). Regulation by 3,5,3'-tri-iodothyronine and FSH of cytochrome P450 family 19 (CYP19) expression in mouse granulosa cells. *Reproduction, Fertility, and Development*, 30(9), 1225–1233. <https://doi.org/10.1071/RD17362>
- Logothetopoulos, J., Dorrington, J., Bailey, D., & Stratis, M. (1995). Dynamics of follicular growth and atresia of large follicles during the ovarian cycle of the guinea pig: fate of the degenerating follicles, a quantitative study. *The Anatomical Record*, 243(1), 37–48. <https://doi.org/10.1002/AR.1092430106>
- Mancini, A., Di Segni, C., Raimondo, S., Olivieri, G., Silvestrini, A., Meucci, E., & Currò, D. (2016). Thyroid Hormones, Oxidative Stress, and Inflammation. *Mediators of Inflammation*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6757154>
- Mathews, D. M., Johnson, N. P., Sim, R. G., O'Sullivan, S., Peart, J. M., & Hofman, P. L. (2021). Iodine and fertility: Do we know enough? *Human Reproduction*, 36(2), 265–274. <https://doi.org/10.1093/humrep/deaa312>
- Matsuda, F., Inoue, N., Manabe, N., & Ohkura, S. (2012). Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. *The Journal of Reproduction and Development*, 58(1), 44–50. <https://doi.org/10.1262/JRD.2011-012>
- McCallum, M. L., Pru, C. A., Smith, A. R., Kelp, N. C., Foretz, M., Viollet, B., Du, M., & Pru, J. K. (2018). A functional role for AMPK in female fertility and endometrial regeneration. *Reproduction*, 156(6), 501–513. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0372>

- McGee, E. A., & Hsueh, A. J. W. (2000). Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles. *Endocrine Reviews*, 21(2), 200–214. <https://doi.org/10.1210/EDRV.21.2.0394>
- Meng, L., Zhao, K., Wang, C. C., Tao, J., Wu, Z., Teerds, K., & Zhang, S. (2021). Characterization of Long Non-Coding RNA Profiles in Porcine Granulosa Cells of Healthy and Atretic Antral Follicles: Implications for a Potential Role in Apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 2677, 22(5), 2677. <https://doi.org/10.3390/IJMS22052677>
- Mulukutla, B. C., Yongky, A., Le, T., Mashek, D. G., & Hu, W. S. (2016). Regulation of Glucose Metabolism – A Perspective From Cell Bioprocessing. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 34, Issue 8, pp. 638–651). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.04.012>
- NAZ, R. K., THURSTON, D., & SANTORO, N. (1995). Circulating tumor necrosis factor (TNF)-alpha in normally cycling women and patients with premature ovarian failure and polycystic ovaries. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y. : 1989)*, 34(3), 170–175. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0897.1995.TB00934.X>
- Núñez-Anita, R. E., Arroyo-Helguera, O., Cajero-Juárez, M., López-Bojorquez, L., & Aceves, C. (2009). A complex between 6-iodolactone and the peroxisome proliferator-activated receptor type gamma may mediate the antineoplastic effect of iodine in mammary cancer. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 89(1–2), 34–42. <https://doi.org/10.1016/J.PROSTAGLANDINS.2009.04.001>
- Olivo-Vidal, Z. E., Rodríguez, R. C., & Arroyo-Helguera, O. (2016). Iodine Affects Differentiation and Migration Process in Trophoblastic Cells. *Biological Trace Element Research*, 169(2), 180–188. <https://doi.org/10.1007/S12011-015-0433-1>
- Orisaka, M., Mizutani, T., Miyazaki, Y., Shirafuji, A., Tamamura, C., Fujita, M., Tsuyoshi, H., & Yoshida, Y. (2023). Chronic low-grade inflammation and ovarian dysfunction in women with polycystic ovarian syndrome, endometriosis, and aging. *Frontiers in Endocrinology*, 14, 1324429. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2023.1324429/BIBTEX>
- Ortiz-Flores, A. E., Luque-Ramírez, M., & Escobar-Morreale, H. F. (2019). Polycystic ovary syndrome in adult women. *Medicina Clinica*, 152(11), 450–457. <https://doi.org/10.1016/J.MEDCLI.2018.11.019>
- Osuka, S., Nakanishi, N., Murase, T., Nakamura, T., Goto, M., Iwase, A., & Kikkawa, F. (2019). Animal models of polycystic ovary syndrome: A review of hormone-induced rodent models focused on hypothalamus-pituitary-ovary axis and neuropeptides. In *Reproductive Medicine and Biology* (Vol. 18, Issue 2, pp. 151–160). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12262>
- Otto-Buczowska, E., Grzyb, K., & Jainta, N. (2018). Polycystic ovary syndrome (PCOS) and the accompanying disorders of glucose homeostasis among girls at the time of puberty. In *Pediatric Endocrinology, Diabetes and Metabolism* (Vol. 24, Issue 1, pp. 38–42). Cornetis. <https://doi.org/10.18544/PEDM-24.01.0101>
- Park, C. J., Oh, J. E., Feng, J., Cho, Y. M., Qiao, H., & Ko, C. M. (2022). Lifetime changes of the oocyte pool: Contributing factors with a focus on ovulatory inflammation. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 49(1). <https://doi.org/10.5653/CERM.2021.04917>

- Riesco-Eizaguirre, G., Leoni, S. G., Mendiola, M., Estevez-Cebrero, M. A., Gallego, M. I., Redondo, A., Hardisson, D., Santisteban, P., & De La Vieja, A. (2014). NIS mediates iodide uptake in the female reproductive tract and is a poor prognostic factor in ovarian cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *99*(7). <https://doi.org/10.1210/JC.2013-4249>
- Roberts, C. K., Hevener, A. L., & Barnard, R. J. (2013). Metabolic syndrome and insulin resistance: Underlying causes and modification by exercise training. *Comprehensive Physiology*, *3*(1), 1–58. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110062>
- Rodríguez-Castelán, J., Corona-Pérez, A., Nicolás-Toledo, L., Martínez-Gómez, M., Castelán, F., & Cuevas-Romero, E. (2017). Hypothyroidism Induces a Moderate Steatohepatitis Accompanied by Liver Regeneration, Mast Cells Infiltration, and Changes in the Expression of the Farnesoid X Receptor. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes : Official Journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, *125*(3), 183–190. <https://doi.org/10.1055/S-0042-112367>
- Rodríguez-Castelán, J., del Moral-Morales, A., Piña-Medina, A. G., Zepeda-Pérez, D., Castillo-Romano, M., Méndez-Tepepa, M., Espindola-Lozano, M., Camacho-Arroyo, I., & Cuevas-Romero, E. (2019a). Hypothyroidism induces uterine hyperplasia and inflammation related to sex hormone receptors expression in virgin rabbits. *Life Sciences*, *230*, 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.05.063>
- Rodríguez-Castelán, J., del Moral-Morales, A., Piña-Medina, A. G., Zepeda-Pérez, D., Castillo-Romano, M., Méndez-Tepepa, M., Espindola-Lozano, M., Camacho-Arroyo, I., & Cuevas-Romero, E. (2019b). Hypothyroidism induces uterine hyperplasia and inflammation related to sex hormone receptors expression in virgin rabbits. *Life Sciences*, *230*, 111–120. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2019.05.063>
- Rodríguez-Castelán, J., Del Moral-Morales, A., Piña-Medina, A. G., Zepeda-Pérez, D., Castillo-Romano, M., Méndez-Tepepa, M., Espindola-Lozano, M., Camacho-Arroyo, I., & Cuevas-Romero, E. (2019). Hypothyroidism induces uterine hyperplasia and inflammation related to sex hormone receptors expression in virgin rabbits. *Life Sciences*, *230*, 111–120. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2019.05.063>
- Rodríguez-Castelán, J., Delgado-González, E., Rodríguez-Benítez, E., Castelán, F., Cuevas-Romero, E., Anguiano, B., Jeziorski, M. C., & Aceves, C. (2023). Preventive Effect of Molecular Iodine in Pancreatic Disorders from Hypothyroid Rabbits. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(19). <https://doi.org/10.3390/IJMS241914903>
- Rodríguez-Castelán, J., Martínez-Gómez, M., Castelán, F., & Cuevas, E. (2015). Hypothyroidism Affects Vascularization and Promotes Immune Cells Infiltration into Pancreatic Islets of Female Rabbits. *International Journal of Endocrinology*, *2015*. <https://doi.org/10.1155/2015/917806>
- Rodríguez-Castelán, J., Méndez-Tepepa, M., Carrillo-Portillo, Y., Anaya-Hernández, A., Rodríguez-Antolín, J., Zambrano, E., Castelán, F., & Cuevas-Romero, E. (2017). Hypothyroidism Reduces the Size of Ovarian Follicles and Promotes Hypertrophy of Periovarian Fat with Infiltration of Macrophages in Adult Rabbits. *BioMed Research International*, *2017*. <https://doi.org/10.1155/2017/3795950>

- Rodríguez-Castelán, J., Méndez-Tepepa, M., Rodríguez-Antolín, J., Castelán, F., & Cuevas-Romero, E. (2018). Hypothyroidism affects lipid and glycogen content and peroxisome proliferator-activated receptor δ expression in the ovary of the rabbit. *Reproduction, Fertility, and Development*, *30*(10), 1380–1387. <https://doi.org/10.1071/RD17502>
- Rodríguez-Castelán, J., Nicolás, L., Morimoto, S., & Cuevas, E. (2015). The Langerhans islet cells of female rabbits are differentially affected by hypothyroidism depending on the islet size. *Endocrine*, *48*(3), 811–817. <https://doi.org/10.1007/S12020-014-0418-4>
- Rodríguez-Castelán, J., Zepeda-Pérez, D., Rojas-Juárez, R., Aceves, C., Castelán, F., & Cuevas-Romero, E. (2022). Effects of hypothyroidism on the female pancreas involve the regulation of estrogen receptors. *Steroids*, *181*. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2022.108996>
- Romanowski, M. D., Parolin, M. B., Freitas, A. C. T., Piazza, M. J., Basso, J., & Urbanetz, A. A. (2015). Prevalência de doença hepática gordurosa não alcoólica em pacientes com síndrome dos ovários policísticos e sua correlação com síndrome metabólica. *Arquivos de Gastroenterologia*, *52*(2), 117–123. <https://doi.org/10.1590/S0004-28032015000200008>
- Rose-John, S. (2020). Interleukin-6 signalling in health and disease. *F1000Research*, *9*. <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.26058.1/DOI>
- Ruebel, M., Shankar, K., Gaddy, D., Lindsey, F., Badger, T., & Andres, A. (2016). Maternal obesity is associated with ovarian inflammation and upregulation of early growth response factor 1. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *311*(1), E269–E277. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00524.2015/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH10121676160004.JPEG>
- Russo, S., Kwiatkowski, M., Govorukhina, N., Bischoff, R., & Melgert, B. N. (2021). Meta-Inflammation and Metabolic Reprogramming of Macrophages in Diabetes and Obesity: The Importance of Metabolites. *Frontiers in Immunology*, *12*, 1. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.746151>
- Saavedra Ramírez, P. G., María Vásquez Duque, G., & Alonso González Naranjo, L. (2011). Interleucina-6: ¿amiga o enemiga? Bases para comprender su utilidad como objetivo terapéutico. In *IATREIA* (Vol. 24, Issue 2).
- Saccon, T. D., Rovani, M. T., Garcia, D. N., Mondadori, R. G., Cruz, L. A. X., Barros, C. C., Bartke, A., Masternak, M. M., & Schneider, A. (2020). Primordial follicle reserve, DNA damage and macrophage infiltration in the ovaries of the long-living Ames dwarf mice. *Experimental Gerontology*, *132*. <https://doi.org/10.1016/J.EXGER.2020.110851>
- Safayee, S., Karbalaeei, N., Noorafshan, A., & Nadimi, E. (2016). Induction of oxidative stress, suppression of glucose-induced insulin release, ATP production, glucokinase activity, and histomorphometric changes in pancreatic islets of hypothyroid rat. *European Journal of Pharmacology*, *791*, 147–156. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2016.08.024>
- Saha, A., Mukherjee, S., Bhattacharjee, A., Sarkar, D., Chakraborty, A., Banerjee, A., & Chandra, A. K. (2019). Excess iodine-induced lymphocytic impairment in adult rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*, *29*(2), 110–118. <https://doi.org/10.1080/15376516.2018.1528647>

- Sakumoto, R., & Okuda, K. (2004). Possible actions of tumor necrosis factor-alpha in ovarian function. *The Journal of Reproduction and Development*, *50*(1), 39–46. <https://doi.org/10.1262/JRD.50.39>
- Sato, A., Sarentonglaga, B., Ogata, K., Yamaguchi, M., Hara, A., Atchalalt, K., Sugane, N., Fukumori, R., & Nagao, Y. (2018). Effects of insulin-like growth factor-1 on the in vitro maturation of canine oocytes. *The Journal of Reproduction and Development*, *64*(1), 83. <https://doi.org/10.1262/JRD.2017-145>
- Sedger, L. M., & McDermott, M. F. (2014). TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *25*(4), 453–472. <https://doi.org/10.1016/J.CYTOGFR.2014.07.016>
- Shi, Y. Q., Zhu, X. T., Zhang, S. N., Ma, Y. F., Han, Y. H., Jiang, Y., & Zhang, Y. H. (2023). Premature ovarian insufficiency: a review on the role of oxidative stress and the application of antioxidants. *Frontiers in Endocrinology*, *14*. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2023.1172481>
- Shkolnik, K., Tadmor, A., Ben-Dor, S., Nevo, N., Galiani, D., & Dekel, N. (2011). Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(4), 1462–1467. https://doi.org/10.1073/PNAS.1017213108/SUPPL_FILE/PNAS.201017213SI.PDF
- Shufelt, C. L., Torbati, T., & Dutra, E. (2017). Hypothalamic Amenorrhea and the Long-Term Health Consequences. *Seminars in Reproductive Medicine*, *35*(3), 256. <https://doi.org/10.1055/S-0037-1603581>
- Silva, J. F., Ocarino, N. M., & Serakides, R. (2018). Thyroid hormones and female reproduction. *Biology of Reproduction*, *99*(5), 907–921. <https://doi.org/10.1093/BIOLRE/IOY115>
- Silva, J. R. V., Lima, F. E. O., Souza, A. L. P., & Silva, A. W. B. (2020). Interleukin-1 β and TNF- α systems in ovarian follicles and their roles during follicular development, oocyte maturation and ovulation. In *Zygote* (Vol. 28, Issue 4). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/S0967199420000222>
- Silva, M. S. B., & Giacobini, P. (2021). New insights into anti-Müllerian hormone role in the hypothalamic–pituitary–gonadal axis and neuroendocrine development. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 78, Issue 1). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03576-x>
- Singh, J., Wong, H., Ahluwalia, N., Go, R. M., & Guerrero-Go, M. A. (2020). Metabolic, Hormonal, Immunologic, and Genetic Factors Associated With the Incidence of Thyroid Disorders in Polycystic Ovarian Syndrome Patients. *Cureus*, *12*(11). <https://doi.org/10.7759/CUREUS.11681>
- Sirotkin, A. v., Chrenek, P., Kolesarová, A., Parillo, F., Zerani, M., & Boiti, C. (2014). Novel regulators of rabbit reproductive functions. *Animal Reproduction Science*, *148*(3–4), 188–196. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2014.06.001>
- Ślebodziński, A. B. (2005). Ovarian iodide uptake and triiodothyronine generation in follicular fluid. The enigma of the thyroid ovary interaction. *Domestic Animal Endocrinology*, *29*(1), 97–103. <https://doi.org/10.1016/J.DOMANIEND.2005.02.029>

- Snider, A. P., & Wood, J. R. (2019). Obesity induces ovarian inflammation and reduces oocyte quality. *Reproduction (Cambridge, England)*, *158*(3), R79–R90. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0583>
- Szeliga, A., Calik-Ksepka, A., Maciejewska-Jeske, M., Grymowicz, M., Smolarczyk, K., Kostrzak, A., Smolarczyk, R., Rudnicka, E., & Meczekalski, B. (2021). Autoimmune Diseases in Patients with Premature Ovarian Insufficiency-Our Current State of Knowledge. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(5), 1–11. <https://doi.org/10.3390/IJMS22052594>
- Țarnă, M., Cima, L. N., Panaitescu, A. M., Martin, C. S., Sirbu, A. E., Barbu, C. G., Pavel, B., Șerbănică, A. N., & Fica, S. (2022). Preconception Counseling in Patients with Hypothyroidism and/or Thyroid Autoimmunity. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, *58*(8). <https://doi.org/10.3390/MEDICINA58081122>
- Umehara, T., Winstanley, Y. E., Andreas, E., Morimoto, A., Williams, E. J., Smith, K. M., Carroll, J., Febbraio, M. A., Shimada, M., Russell, D. L., & Robker, R. L. (2022). Female reproductive life span is extended by targeted removal of fibrotic collagen from the mouse ovary. *Science Advances*, *8*(24). <https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABN4564>
- Van Der Poll, T., Romijn, J. A., Wiersinga, W. M., & Sauerwein, H. P. (1990). Tumor necrosis factor: a putative mediator of the sick euthyroid syndrome in man. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *71*(6), 1567–1572. <https://doi.org/10.1210/JCEM-71-6-1567>
- Varfolomeev, E., & Vucic, D. (2018). Intracellular regulation of TNF activity in health and disease. *Cytokine*, *101*, 26–32. <https://doi.org/10.1016/J.CYTO.2016.08.035>
- Vidal, Z. E. O., Rufino, S. C., Tlaxcalteco, E. H., Trejo, C. H., Campos, R. M., Meza, M. N., Rodríguez, R. C., & Arroyo-Helguera, O. (2014). Oxidative stress increased in pregnant women with iodine deficiency. *Biological Trace Element Research*, *157*(3), 211–217. <https://doi.org/10.1007/S12011-014-9898-6>
- Wajner, S. M., Goemann, I. M., Bueno, A. L., Larsen, P. R., & Maia, A. L. (2011). IL-6 promotes nonthyroidal illness syndrome by blocking thyroxine activation while promoting thyroid hormone inactivation in human cells. *The Journal of Clinical Investigation*, *121*(5), 1834. <https://doi.org/10.1172/JCI44678>
- Wang, D., Weng, Y., Zhang, Y., Wang, R., Wang, T., Zhou, J., Shen, S., Wang, H., & Wang, Y. (2020). Exposure to hyperandrogen drives ovarian dysfunction and fibrosis by activating the NLRP3 inflammasome in mice. *Science of The Total Environment*, *745*, 141049. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.141049>
- Wang, L., Tang, J., Wang, L., Tan, F., Song, H., Zhou, J., & Li, F. (2021). Oxidative stress in oocyte aging and female reproduction. *Journal of Cellular Physiology*, *236*(12), 7966–7983. <https://doi.org/10.1002/JCP.30468>
- Wang, S., Yang, H. X., Fu, Y. L., Teng, X. M., Wang, C. C., & Xu, W. M. (2022). The Key Role of Peroxisomes in Follicular Growth, Oocyte Maturation, Ovulation, and Steroid Biosynthesis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2022*. <https://doi.org/10.1155/2022/7982344>

- Warzych, E., & Lipinska, P. (2020). Energy metabolism of follicular environment during oocyte growth and maturation. *The Journal of Reproduction and Development*, 66(1), 1. <https://doi.org/10.1262/JRD.2019-102>
- Weng, X., Ma, X., Wang, Q., Xu, K., Hu, X., Liu, W., & Zhang, C. (2019). Effect of hypothyroidism on CYP51 and FSHR expression in rat ovary. *Theriogenology*, 138, 145–151. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2019.07.012>
- Wondmkun, Y. T. (2020). Obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes: Associations and therapeutic implications. In *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* (Vol. 13, pp. 3611–3616). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S275898>
- Wu, R., Fujii, S., Ryan, N., ... K. V. der H.-H., & 2007, undefined. (n.d.). Ovarian leukocyte distribution and cytokine/chemokine mRNA expression in follicular fluid cells in women with polycystic ovary syndrome. *Academic.Oup.Com*. Retrieved November 27, 2022, from <https://academic.oup.com/humrep/article-abstract/22/2/527/2939075>
- Yan, F., Zhao, Q., Li, Y., Zheng, Z., Kong, X., Shu, C., Liu, Y., & Shi, Y. (2022). The role of oxidative stress in ovarian aging: a review. *Journal of Ovarian Research*, 15(1), 100. <https://doi.org/10.1186/S13048-022-01032-X>
- Yang, D. L., Xu, J. W., Zhu, J. G., Zhang, Y. L., Xu, J. B., Sun, Q., Cao, X. N., Zuo, W. L., Xu, R. S., Huang, J. H., Jiang, F. N., Zhuo, Y. J., Xiao, B. Q., Liu, Y. Z., Yuan, D. B., Sun, Z. L., He, H. C., Lun, Z. R., Zhong, W. de, & Zhou, W. L. (2017). Role of GPR30 in estrogen-induced prostate epithelial apoptosis and benign prostatic hyperplasia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 487(3), 517–524. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.04.047>
- Yang, Y., Jiang, H., Xiao, L., & Yang, X. (2018). MicroRNA-33b-5p is overexpressed and inhibits GLUT4 by targeting HMGA2 in polycystic ovarian syndrome: An in vivo and in vitro study. *Oncology Reports*, 39(6), 3073–3085. <https://doi.org/10.3892/OR.2018.6375>
- Yoshimura, Y., & Barua, A. (2017). Female Reproductive System and Immunology. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1001, 33–57. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3975-1_3
- Zhang, Y., & Zhang, H. (2020). [Research advances in regulating mechanisms of mammalian ovarian folliculogenesis]. *Sheng Li Xue Bao: [Acta Physiologica Sinica]*, 72(1), 63–74. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32099984/>
- Zhou, F., Shi, L. B., & Zhang, S. Y. (2017). Ovarian Fibrosis: A Phenomenon of Concern. *Chinese Medical Journal*, 130(3), 365. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.198931>
- Zhou, J., Peng, X., & Mei, S. (2019a). Autophagy in ovarian follicular development and Atresia. In *International Journal of Biological Sciences* (Vol. 15, Issue 4, pp. 726–737). Ivyspring International Publisher. <https://doi.org/10.7150/ijbs.30369>
- Zhou, J., Peng, X., & Mei, S. (2019b). Autophagy in ovarian follicular development and Atresia. In *International Journal of Biological Sciences* (Vol. 15, Issue 4, pp. 726–737). Ivyspring International Publisher. <https://doi.org/10.7150/ijbs.30369>

Zore, T., Joshi, N. v., Lizneva, D., & Azziz, R. (2017). Polycystic Ovarian Syndrome: Long-Term Health Consequences. *Seminars in Reproductive Medicine*, 35(3), 271–281. <https://doi.org/10.1055/S-0037-1603096>