



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**

**“CUANTIFICACIÓN DE RECEPTORES α y β -ESTROGÉNICOS
EN EL TEJIDO UTERINO DE RATAS OBESAS ZUCKER
TRATADAS CON ACETATO DE LEUPROLIDE”**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIOLOGA
PRESENTA**

LIZBETH OUIELHE ALFARO

DIRECTORA DE TESIS

DRA. ANGELICA TRUJILLO HERNÁNDEZ

CODIRECTOR DE TESIS

M. EN BRA. ALAIN PRIEGO CORTÉS

ABRIL, 2025



Índice de contenido

Lista de abreviaturas.....	4
Lista de figuras y graficas	6
Lista de tablas	6
Resumen	7
Introducción	8
Útero	8
• Morfología.....	8
• Histología.....	9
• Fisiología general.....	9
• Ciclo uterino.....	11
Obesidad y problemas reproductivos	15
Modelos animales para el estudio de la obesidad.....	16
Infertilidad asociada al útero	18
Acetato de leuprolide	19
Antecedentes.....	20
Obesidad y patología uterina.....	20
Enfoques con animales para investigar la obesidad	21
Acetato de leuprolide (LEU) y endometrio	22
Justificación	25
Pregunta de investigación.....	25
Objetivo general	26
Objetivos específicos.....	26
Hipótesis.....	26
Metodología	26
Diseño experimental.....	27
Procedimiento de autopsia	27
Preparación de muestras	28
Inmunohistoquímica.....	29
Análisis del útero.....	30
Análisis estadístico	31
Resultados.....	32
Parámetros zoométricos.....	32
Parámetros histológicos.....	36

Inmunohistoquímica	40
Discusión	46
Conclusión.....	53
Bibliografía citada:	54

Lista de abreviaturas

AF-1	Dominio activador 1
AF-2	Dominio activador 2
ANOVA	Análisis de varianza
ARNm	Ácido Ribonucleico Mensajero
CICUAL	Comité para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio
c-Myc	Factor de transcripción protooncogénico c-Myc
DAB	Diaminobenzidina
DBD	Domino de unión al DNA
DNA	Acido desoxirribonucleico
E2	Estradiol
ER	Receptor de estrógenos
ERK	Quinasa regulada por señales exteriores
ERα	Receptor de estrógenos alfa
ERβ	Receptor de estrógenos beta
ESR1	Gen de codificación para el receptor de estrógeno alfa
ESR2	Gen de codificación para el receptor de estrógeno beta
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
FIV	Fertilización <i>in vitro</i>
FSH	Hormona foliculoestimulante
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
GPα/ GPR30	Receptor estrogénico acoplado de proteína G
H₂O₂	Peróxido de hidrogeno
HPO	Eje hipotalámico-pituitario-ovárico
IAC	Índice de adiposidad corporal
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de masa corporal
INSP	Instituto nacional de salud publica
LBD	Domino de unión al ligando
LEU	Acetato de leuprolide
LH	Hormona luteinizante

MAP	Quinasa activada por mitógeno
OLETF	Ratas obesas Otsuka Long-Evans Tokushima
OMS	Organización mundial de la salud
OVX	Ovariectomía
OZDF	Rata obesa diabética Zucker
P4	Progesterona
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SHO	Síndrome de hiperestimulación ovárica
SHROB	Rata obesa espontáneamente hipertensa
SNC	Sistema nervioso central
SOP	Síndrome de ovario poliquístico
SPM	Síndrome premenstrual
TAG	Triacilgliceroles
TNF-α	Factor de necrosis tumoral
WFR	Ratas obesas Wistar

Lista de figuras y graficas

Figura 1. Útero de rata	8
Figura 2. Dominios estructurales y funcionales de receptores ER y sus similitudes	12
<i>Figura 3.</i> Mecanismos principales de señalización de los receptores estrógeno (ER)..	15
Figura 4. Datos morfométricos.....	28
<i>Figura 5.</i> Secciones transversales del cuerno uterino derecho	31
Figura 6. Gráfico del peso corporal	32
Figura 7. Gráfico del peso relativo de la grasa abdominal y pélvica.....	33
Figura 8. Gráfico del índice de adiposidad	34
Figura 9. Gráfico del peso relativo del útero	35
Figura 10. Morfología del cuerno uterino derecho	36
Figura 11. Comparacion de utero en ratas Long-Evans y Zucker.....	37
Figura 12. Gráfico del diámetro promedio del útero	38
Figura 13. Gráfico del espesor endometrial del útero.....	39
Figura 14. Inmunohistoquímica de ER α en ratas Long-Evans	40
Figura 15. Inmunohistoquímica de ER α en ratas Zucker.....	41
Figura 16. Gráfico del número de marcaje de ER α	42
Figura 17. Inmunohistoquímica de ER β en ratas Long-Evans	43
Figura 18. Inmunohistoquímica de ER β en ratas Zucker.....	44
Figura 19. Gráfico del número de marcaje de ER β	45

Lista de tablas

Tabla 1. Procedimiento para la preparación e inclusión de muestras.....	29
---	----

Resumen

La obesidad es un trastorno metabólico crónico que predispone al desarrollo de enfermedades uterinas como fibromas, endometriosis y cáncer. Este estudio evaluó el efecto del agonista de GnRH, acetato de leuprolide (LEU), en el espesor endometrial y la expresión de los receptores estrogénicos ER α y ER β en ratas Zucker obesas y Long-Evans, mediante una curva dosis-respuesta.

Hembras de ambas cepas, de 60 a 70 días de edad, se asignaron aleatoriamente a grupos control, vehículo (solución salina) y tres dosis de LEU (1.25 μ g, 2.5 μ g y 5 μ g), administradas por vía subcutánea durante tres días. Se obtuvieron cuernos uterinos y se procesaron por inmunohistoquímica para cuantificar la expresión de los receptores.

La administración de LEU redujo el espesor endometrial en ambas cepas y modificó el diámetro uterino. En ratas Zucker obesas, la dosis más baja incrementó significativamente la expresión de ER α . En contraste, LEU disminuyó la expresión de ER β en ratas Long-Evans, mientras que en Zucker obesas el efecto fue menos marcado y dependiente de la dosis.

Estos resultados evidencian una respuesta diferencial al tratamiento con LEU según la cepa y el estado metabólico, lo que podría ser relevante para el diseño de terapias hormonales en contextos de obesidad.

Introducción

Útero



Figura 1. Útero de rata Long-Evans

- Morfología

El útero es un órgano hueco, musculoso de paredes gruesas, tiene una apariencia de pera invertida en humanos o tubular en ratas, presenta vasos linfáticos en la pared conformando un abundante plexo situado en el mesometrio y el parametrio, los nervios se sitúan en el plexo de la base del ligamento ancho a cada lado del cuello uterino (Ramírez-González *et al.*, 2016), sostenido por varios ligamentos: un par de ligamentos cervicales enlazan el cuello uterino y la vagina con la pared pélvica, ligamentos redondos ligan el extremo del útero cerca de la entrada de los oviductos y por el otro extremo a la pared pélvica inferior (Jones, 2014).

- Histología

El útero presenta varias capas con características específicas: (1) En la superficie externa, el perimetrio constituye una capa gruesa de músculo liso, recubierta por la serosa peritoneal. Esta capa está dotada de una densa red de vasos linfáticos, sanguíneos y fibras nerviosas. (2) El miometrio, es responsable de las contracciones uterinas y contiene una capa de tejido conjuntivo-vascular que alberga grandes arterias, vasos linfáticos y venas. (3) En la superficie interna, el endometrio, o membrana mucosa, está compuesto por una capa funcional de epitelio de revestimiento y glándulas altamente sensibles a las hormonas reproductivas, que se desprende total o parcialmente durante el ciclo estral. Además, cuenta con una capa de estrato basal que contiene vasos sanguíneos que generan el estrato funcional. Aunque esta capa basal contiene menos células que el estrato funcional, se mantiene constante a lo largo del ciclo (Ramírez-González et al., 2016). Las glándulas endometriales o uterinas son invaginaciones secretoras tubulares del epitelio luminal, presentando una capa de mucina (Kateryna Sikora et al., 2021). La luz uterina tiene un aspecto de hendidura u forma ovalada en el centro del tubo.

- Fisiología general

El útero es el órgano más importante para la recepción del ovulo fecundado, este crea condiciones para la implantación, maduración, alojamiento y nutrición del embrión durante la gestación hasta el momento de expulsión del feto (Kateryna Sikora et al., 2021).

Los esteroides ováricos influyen en el útero, regulando su actividad según los cambios hormonales provocados por el ovario. La proliferación y diferenciación del epitelio uterino están controladas principalmente por estradiol, progesterona y diversos factores de crecimiento (Jesús A. F. Tresguerres et al., 2005). Los estrógenos interactúan con sus receptores específicos y también inducen indirectamente factores como IGF-I, el factor transformador de crecimiento α y el factor de crecimiento epidérmico. Por su parte, la progesterona juega un papel crucial en la conversión del endometrio de un patrón

proliferativo a uno secretor, favoreciendo la proliferación celular en la capa basal (Hoffman et al., 2012).

Tras la menstruación, el endometrio tiene un grosor de 1-2 mm. Bajo la influencia de los estrógenos, las células glandulares y el estroma de la capa funcional proliferan rápidamente, dando inicio a la fase proliferativa, que coincide con la fase folicular ovárica. A medida que avanza esta fase, las glándulas se alargan y las células que recubren su luz se pseudoestratifican, mientras que el estroma permanece compacto. El grosor endometrial alcanza cerca de 12 mm en el pico de LH, sin presentar incrementos significativos después de este punto (Hoffman et al., 2012).

Después de la ovulación, el endometrio se transforma en tejido secretor, asociada con la fase lútea del ciclo ovárico. Bajo la acción de la progesterona, las vacuolas en las células glandulares se desplazan hacia la luz y liberan su contenido, alcanzando su máximo alrededor del sexto día post-ovulación, coincidiendo con el día de la implantación (Hoffman et al., 2012).

La receptividad uterina, que ocurre entre los días 20 y 24 del ciclo menstrual, es fundamental para la implantación del blastocisto, permitiendo su unión e invasión del trofotodermo en el endometrio. Además, para que la receptividad uterina sea efectiva, se requieren moléculas de adhesión celular, como las integrinas, así como inmunoglobulinas y citocinas (Revel, 2012)

Si no ocurre la implantación del blastocisto y el cuerpo lúteo no se mantiene por la hCG placentaria, los niveles de progesterona disminuyen, lo que provoca el colapso de las glándulas endometriales. Las prostaglandinas, especialmente la prostaglandina F₂α (PGF₂α), desempeñan un papel clave en la regulación del ciclo reproductivo, induciendo contracciones miometriales y ayudando a la expulsión del tejido endometrial mediante un vasoespasmo arteriolar (Andersson, 2008).

Con la menstruación, la capa funcional del endometrio se desprende, dejando solo la capa basal, que proporciona las células necesarias para la regeneración del endometrio. La reepitelización del endometrio comienza entre 2 y 3 días después del inicio de la menstruación y se completa en 48 horas (Hoffman et al., 2012).

- Ciclo uterino

El útero experimenta un ciclo que es regido por el ovario y su secreción hormonal; durante el cual su revestimiento atraviesa distintas etapas: (1) proliferación del endometrio, sucede al finalizar la fase folicular ovárica, en este punto se añade una nueva capa de células al endometrio bajo la influencia de los estrógenos, (2) desarrollo de cambios secretores, por acción del cuerpo lúteo, el endometrio sigue proliferando y se convierte en una estructura secretora por acción de la progesterona, (3) descamación del endometrio, se conoce como menstruación, asociada con el comienzo de la fase folicular del ovario (Hall & Guyton, 2011). La organización estructural del endometrio cambia según la fase del ciclo en que se encuentren, manifestándose en cambios en el tamaño y forma de las luces de las glándulas, su actividad, vascularización así como el espesor del estroma (Kateryna Sikora et al., 2021).

Estrógenos

El estrógeno es una hormona esteroidea natural que se produce de forma endógena a partir del colesterol (Krishnan et al., 2000). Los principales estrógenos endógenos son la estrona, que predomina en la menopausia; el estradiol, el más potente y abundante durante la edad reproductiva; y el estriol, que se produce principalmente durante el embarazo. Esta hormona desempeña un papel fundamental en los ciclos reproductivos menstruales y estrales, así como en la fisiología de órganos como las mamas, los ovarios y el endometrio. Además, influye en el metabolismo de los lípidos, la síntesis de proteínas y el comportamiento (Kiyama & Wada-Kiyama, 2015).

Un exceso o deficiencia de estrógenos puede llevar a problemas de salud, como síndrome premenstrual (SPM), endometriosis, fibromas, o complicaciones en la menopausia.

Receptores

La actividad de los estrógenos es controlada por sus receptores hormonales específicos, estos receptores proteínas que actúan como factores de transcripción nucleares, cuya actividad reguladora transcripcional está mediada por la unión del esteroide específico a esta molécula. Los estrógenos se difunden hacia el núcleo de las células y se unen con receptores específicos, en dos isoformas ER α y ER β (Hoffman et al., 2012).

Los receptores estrogénicos se componen de 5 dominios estructurales y funcionales (Figura 1): un dominio amino terminal (dominio A/B), un dominio de unión al DNA (DBD, dominio C), una región bisagra (dominio D), un dominio de unión ligando (LBD, dominio E) y el dominio carboxilo terminal (dominio F) (Figura 1). Con respecto de los receptores ER α y ER β , los dominios C y E presentan un alto grado de homología entre las dos isoformas, mientras que los dominios A/B, D y F muestran diferencias significativas (Hamilton et al., 2017). El dominio A/B alberga la función de activación de la transcripción 1 (AF-1), esencial para la transactivación que no depende del ligando. En contraste, el dominio E, también conocido como LBD (ligand-binding domain), contiene la función de activación de la transcripción 2 (AF-2), que es crucial para la regulación transcripcional que depende del ligando. (Hamilton et al., 2017)

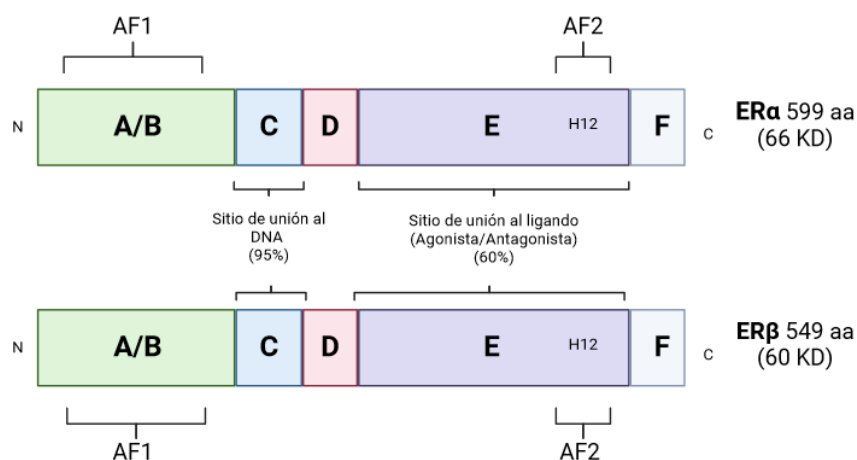


Figura 2. Dominios estructurales y funcionales de receptores ER y sus similitudes. Elaborado por Lizbeth Ouielhe Alfaro (modificado de Hamilton et al., 2017 & Hewitt et al., 2016)

En los humanos, ambos receptores se encuentran en diferentes tejidos y células, regulando diversas funciones en los sistemas reproductivo, esquelético y cardiovascular. El receptor estrogénico alfa (ER α) está presente en glándulas mamarias, útero, ovarios (en las células tecales), huesos, hígado, tejido adiposo, órganos reproductores masculinos, glándulas suprarrenales y tiroideas (Paterni et al., 2014), y se localiza en el cromosoma 6q25.1-q25.2. En contraste, en la rata, ER α se expresa en glándulas suprarrenales, cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmón, músculos, bazo, testículos, timo, útero y ovarios, y está ubicado en el cromosoma 1q11 (Yu et al., 2014).

El receptor estrogénico beta (ER β) en humanos se encuentra en la próstata, la vejiga, el ovario (en las células de la granulosa), el colon, el tejido adiposo, el sistema nervioso

central, el esófago, la placenta, la tiroides, el intestino delgado, los pulmones, el tejido mamario, los huesos y el útero, y está posicionado en el cromosoma 14q23.2-q23.3 (Paterni et al., 2014). Por otro lado, en ratas, ER β se expresa en el cerebro, pulmones, músculos, bazo, testículos, timo, ovarios y útero, y se encuentra en el cromosoma 6q24 (Yu et al., 2014).

Los perfiles de expresión de ER α y ER β en el útero son distintos, se expresan en el epitelio luminal, epitelio glandular, el estroma endometrial, células del músculo liso miometrial, aunque la mayor parte se reporta en el endometrio, células luminales y glandulares (Kateryna Sikora et al., 2021)

ER β modera las acciones no deseadas de los estrógenos al inhibir la actividad de ER α . Aunque ER β se une al estrógeno (E2) con una afinidad similar a ER α , ejerce sus efectos a través de la vía de señalización clásica. En presencia de concentraciones elevadas de E2, ER β actúa como un represor trans-dominante de la actividad transcripcional de ER α . Los niveles más altos de expresión de ER β se observan en la fase proliferativa del ciclo uterino (Weihua et al., 2000).

ER α regula la transcripción activada por ligando en tejidos sensibles a los estrógenos. La progesterona altera la sensibilidad al E2 al reducir los niveles de ER α en el útero de la rata a medida que aumentan los niveles séricos de progesterona. Aunque ER β está presente en menor cantidad en las células, no puede reemplazar la ausencia de ER α , ya que ER α regula positivamente las concentraciones de progesterona en el estroma y el miometrio, mientras que regula negativamente los niveles en las células epiteliales (Sahlin et al., 2006).

Durante la fase folicular y proliferativa, cuando los estrógenos están elevados y la progesterona baja, la luz del útero se agranda, lo que lleva a un aumento en la expresión de ER β . En la fase lútea y de ovulación, cuando los estrógenos disminuyen y la progesterona aumenta, los niveles de ER α disminuyen. Ambos receptores se coexpresan en el tejido uterino con cambios cíclicos (Matsuzaki, 1999).

Existen mecanismos para regular la activación de los receptores, provocando una desensibilización que restringe la duración de la respuesta al atenuar la sensibilidad de las células a una concentración hormonal constante durante una exposición prolongada.

Se han identificado y caracterizado tres mecanismos principales de señalización transcripcional mediada por los receptores de estrógeno (ER), así como un mecanismo no genómico (Figura 2). Estos incluyen: (1) la unión directa a elementos reguladores del ADN o clásica, (2) la unión indirecta a otros factores de transcripción unidos al ADN, (3) la activación del receptor independiente del ligando, que implica una fosforilación alterada de sitios en la proteína del receptor, y (4) la señalización no genómica (Hewitt et al., 2016). En el modelo clásico de respuesta a los estrógenos los ligandos de estrógeno se difunden a través del plasma y las membranas nucleares para unirse al ER, lo que resulta en un cambio conformacional en el receptor, transformándolo a un estado activado que interactúa con la cromatina a través de mediadores transcripcionales (Hewitt et al., 2016). El segundo mecanismo de activación del receptor de esteroides, que es independiente de ER, involucra la conexión del receptor activado por el ligando con factores de transcripción que están directamente unidos al ADN mediante sus respectivos elementos de respuesta (Hewitt et al., 2016).

En la tercera vía de acciones independientes del ligando Los factores de crecimiento peptídicos pueden activar la expresión génica mediada por ER α mediante la activación de la proteína quinasa activada por mitógenos de ER α en ausencia de E2. Asimismo, los factores de crecimiento pueden imitar los efectos de E2 en el útero de roedor mediante la activación independiente de E2 de ER α . En algunos casos, la proteína MAP quinasa ERK se recluta junto con ER α en la cromatina (Hewitt et al., 2016).

La cuarta vía, no genómica, involucra la rápida activación de la óxido nítrico sintasa endotelial en las células endoteliales, así como el aumento de la conductancia. Un posible mediador de esta respuesta hormonal rápida, localizada en la membrana, es el receptor de estrógeno acoplado a la proteína G (GPER), anteriormente conocido como GPR30, que es activado por E2 (Hewitt et al., 2016).

La expresión de receptores de estrógeno y progesterona en el endometrio se encuentra altamente regulada a través del ciclo menstrual, lo que proporciona un mecanismo adicional para el control de los efectos de los esteroides en el desarrollo y la función endometriales. Los receptores de estrógeno se expresan en el núcleo de las células epiteliales, del estroma y miometriales, y las concentraciones alcanzan su máximo durante la fase proliferativa; sin embargo, durante la fase lútea, las concentraciones de

progesterona mitigan la expresión de receptores de estrógenos. Los receptores endometriales de progesterona alcanzan su máximo a mitad del ciclo, en respuesta al incremento de las concentraciones de estrógenos.

Hacia la parte media de la fase lútea, la expresión de receptores de progesterona en el epitelio glandular es prácticamente nula, aunque la expresión permanece fuerte en el compartimiento del estroma (Lessey, 1988).

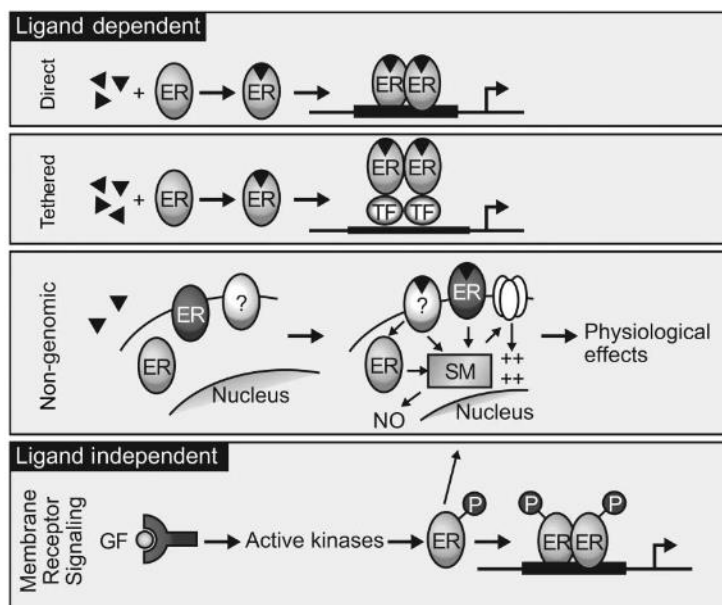


Figura 3. Mecanismos principales de señalización transcripcional mediada por los receptores de estrógeno (ER) (Hewitt et al., 2016).

Obesidad y problemas reproductivos

La obesidad es una enfermedad crónica multifactorial que resulta del desequilibrio metabólico debido a la disfunción del tejido adiposo.

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son generadas durante el metabolismo aeróbico normal. Sin embargo, cuando la producción de ROS excede la capacidad del sistema antioxidante para neutralizarlas, se produce un desequilibrio que daña estructuras celulares clave como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Carvajal, 2019). Este desajuste, originado por una sobreproducción de ROS y una reducción en las defensas antioxidantes, da lugar a una inflamación crónica que favorece el estrés oxidativo. A medida que aumentan los niveles de ROS, se pueden ver implicados en el desarrollo de diversas enfermedades, como la diabetes, trastornos metabólicos y

enfermedades cardiovasculares. Además, este proceso está asociado con efectos patológicos, como el incremento en el tamaño y volumen de los adipocitos (Crujeiras & Casanueva, 2015).

El tejido adiposo, es especialista en almacenar energía en forma de triacilgliceroles (TAG), actúa como un órgano metabólico y endocrino que secreta adipocitoquinas y citocinas, regulando el metabolismo de los esteroides sexuales (Crujeiras & Casanueva, 2015), la ingesta de alimentos, el eje reproductivo, la sensibilidad a la insulina y respuestas inmunes (Richard et al., 2000). La adiponectina se correlaciona inversamente con la grasa corporal, desempeña funciones en la maduración de los ovocitos, proliferación y muerte de las células de la granulosa, así como ajusta la secreción de estradiol y progesterona (Crujeiras & Casanueva, 2015). La leptina en cantidades elevadas afecta la frecuencia y amplitud de los pulsos de LH ya que las citocinas proinflamatorias suprimen de forma dosis-dependiente los pulsos (Al-Yasiry, R. et al., 2022), por tanto, restringe la esteroidogénesis e interrumpe el proceso de ovulación, así como retrasos en el crecimiento de los ovocitos, desempeñando un papel inhibitor en el eje HPO como resultado de la inflamación crónica (Crujeiras & Casanueva, 2015).

El exceso de grasa corporal perturba el eje HPO a través de vías centrales y periféricas, afectando negativamente la capacidad reproductiva. Esto puede provocar afecciones reproductivas como tasas de concepción más bajas, mayor infertilidad, pubertad temprana o tardía, trastornos ovulatorios e incluso hipogonadismo debido al desequilibrio en la homeostasis energética (Crujeiras & Casanueva, 2015). También se observa un aumento en los niveles de estrógenos y estrona, disfunción endotelial por citocinas proinflamatorias y ROS (Al-Yasiry et al., 2022), disminución en la amplitud del pulso de LH durante la fase folicular, prolongándola, así como fases lúteas cortas (Penzias et al., 2021). Este síndrome metabólico representa un importante problema de salud pública, lo que acentúa la necesidad de desarrollar estrategias efectivas para su tratamiento.

Modelos animales para el estudio de la obesidad

En la investigación preclínica, se han realizado importantes avances mediante el uso de modelos animales que replican la enfermedad humana. Los modelos murinos son particularmente útiles para estudiar la obesidad, ya que comparten características con los humanos y son prácticos en términos de cuidado y costo relativamente bajo (Doulberis

et al., 2020). Entre los roedores más utilizados están el ratón y la rata de laboratorio. Se emplean dos tipos principales de modelos animales para estudiar la obesidad: los monogénicos, que presentan mutaciones en un solo gen relacionado con la leptina, y los poligénicos, que inducen obesidad mediante dietas específicas, como dietas altas en grasas que ofrecen alta densidad energética o dietas de cafetería que promueven la obesidad debido al exceso de energía acumulada por un aumento de grasas y el gasto energético insuficiente de estos animales. También existen modelos menos comunes que se crean mediante enfoques químicos o quirúrgicos (Doulberis et al., 2020).

Aunque los estudios epidemiológicos proporcionan valiosa información, es necesario utilizar modelos animales para abordar aspectos experimentales por razones éticas y metodológicas (Escalona Mugica et al., 2021). Entre los modelos animales para la obesidad, se encuentran las ratas Zucker diabéticas grasas (OZDF), ratas grasas Otsuka Long-Evans Tokushima (OLETF), ratas grasas Wistar (WFR), ratones db/db, ratones ob/ob, ratón Tubby, ratón Agouti, raton Mahogany, ratón fat/fat, ratas Sprague-Dawley, DS rata obesa, rata Koletsky, (Rata obesa espontáneamente hipertensa -SHROB), ratón M16 (Beck, 2000; Doulberis et al., 2020).

La rata Zucker diabética obesa (OZDF) es el modelo preferido para investigar la obesidad, este modelo comparte varias características con la obesidad en humanos, como la hiperfagia, hipertriacilglicerolemia, hiperinsulinemia, hiperlipidemia, hipertensión y alteraciones en la tolerancia a la glucosa (Pandey & Dvorakova, 2020). Los cambios metabólicos en estas ratas comienzan a ser evidentes entre la tercera y la quinta semana de edad, momento en el cual su peso aumenta casi el doble en comparación con sus compañeros de camada delgados (Wang et al., 2014). Presenta una mutación en el receptor de leptina, lo que impide que la leptina ejerza su efecto supresor sobre la ingesta de alimentos a través de sus receptores en el SNC. Esta disfunción en la señalización de la leptina causa importantes variaciones en las redes neuropeptídicas (Beck, 2000). Además, se ha observado que las ratas obesas tienen niveles elevados de triglicéridos y colesterol en comparación con las ratas delgadas, lo que se atribuye a la lipotoxicidad derivada del metabolismo excesivo de ácidos grasos (Pandey & Dvorakova, 2020).

La rata de laboratorio presenta un ciclo estral, que difiere del ciclo menstrual humano. Mientras que el ciclo menstrual de las mujeres, con una duración aproximada de 28 días,

se divide en varias fases: menstruación, fase folicular, ovulación y fase lútea (Hoffman et al., 2012) el ciclo estral de las ratas dura entre 4 y 5 días. Las ratas son animales poliestros que presentan cuatro fases distintas en su ciclo estral: (1) Proestro (fase folicular), una etapa breve con una duración promedio de 14 horas, caracterizada por la presencia predominante de células epiteliales nucleadas, pequeñas, redondas y de tamaño relativamente uniforme. (2) Estro (ovulación), con una duración que varía entre 24 y 48 horas, se distingue por la presencia de células epiteliales queratinizadas predominantemente anucleadas. (3) Metaestro o Diestro I, una fase corta de 6 a 8 horas, se caracteriza por una mezcla de células epiteliales queratinizadas anucleadas y neutrófilos. (4) Diestro o Diestro II, la fase más prolongada del ciclo estral, con una duración promedio de 48 a 72 horas, se distingue por una disminución significativa en el número de células epiteliales queratinizadas anucleadas, aunque no se elimina completamente su presencia (Tammy Fernández-Romero et al., 2021). A diferencia del ciclo menstrual, el ciclo estral de las ratas no incluye el desprendimiento del revestimiento uterino ni sangrado; en cambio, las ratas experimentan variaciones hormonales y de comportamiento que afectan su receptividad sexual y producción hormonal, siendo receptivas al apareamiento únicamente durante la fase del estro (Kateryna Sikora et al., 2021).

Las ratas Zucker exhiben ciclos estrales prolongados, que duran de 7 a 8 días, con una extensión prolongada de la fase de diestro y un desarrollo folicular limitado en la mayoría de los casos. Asimismo, suelen mostrar niveles plasmáticos reducidos de estradiol y elevados de progesterona (Marín Bivens y Olster, 1997; Keen-Rhinehart y Kalra, 2004). Aunque el útero de las ratas comparte similitudes con el humano en términos de histología, función y dependencia hormonal, se diferencia en su forma bicornes, su ciclo estral y la ausencia de menstruación (Kateryna Sikora et al., 2021).

Infertilidad asociada al útero

El útero desempeña un papel esencial en el proceso reproductivo, lo que convierte a las anomalías uterinas, ya sean congénitas o adquiridas, en responsables del 10% de los casos de infertilidad femenina con varias causas posibles, incluidos trastornos reproductivos, malformaciones congénitas, infecciones, disfunciones hormonales y obesidad (Gonnella et al., 2024; Jaime Albornoz & Gonzalo Duque, 2010). Los principales

factores que contribuyen a estas anomalías son los miomas uterinos, pólipos endometriales, adherencias intrauterinas y endometriosis. Estas alteraciones pueden surgir de un conjunto de problemas en el desarrollo embrionario, como la fusión o migración de los conductos de Müller (Jaime Albornoz & Gonzalo Duque, 2010).

Estas anomalías interfieren mecánicamente con el transporte de espermatozoides y la implantación de embriones. Durante la implantación, el embrión debe establecer un contacto estrecho con un endometrio hormonalmente preparado, siendo una cavidad uterina anatómicamente normal uno de los requisitos para lograr una implantación exitosa. Tanto las anomalías congénitas como las enfermedades adquiridas del útero pueden obstaculizar la implantación y placentación normales, lo que puede llevar a la infertilidad y a la pérdida del embarazo (Taylor & Gomel, 2008).

Cualquier alteración, incluidas las anomalías anatómicas, puede afectar esta sincronía. Esta configuración anormal del útero se asocia con un aumento en las complicaciones obstétricas, como abortos espontáneos, embarazos ectópicos, presentaciones anormales, incompetencia cervical y parto prematuro (Lin et al., 2002).

Acetato de leuprolide

El acetato de leuprolide es un nonapéptido sintético que actúa como agonista del receptor de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Como agonista, puede ocupar el sitio activo del receptor, generando un efecto similar al de la hormona natural, a pesar de las diferencias en sus estructuras moleculares.

La GnRH tiene una vida media de 2 a 5 minutos y actúa como un puente entre los sistemas neural y endocrino (Wilson et al., 2007). En cambio, el acetato de leuprolide, con una vida media de aproximadamente 3 horas, se emplea debido a una mayor estabilidad y alta afinidad por los receptores de GnRH en la hipófisis, lo que facilita su uso clínico prolongado (Teutonico et al., 2012).

Cuando se administra de forma continua durante períodos prolongados, LEU actúa como un inhibidor de las gonadotropinas, provocando una desensibilización de los receptores hipofisarios, esto desencadena una disminución en la secreción de gonadotropinas y en los niveles de estrógenos y progesterona, que se observa entre una y dos semanas después del inicio del tratamiento con el agonista de GnRH (Hoffman et al., 2012), resultando en una disminución, e incluso en la inhibición, de la liberación de LH (hormona

luteinizante) y FSH (hormona folículo estimulante). Sin embargo, en las fases iniciales del tratamiento, se observa un aumento transitorio en las secreciones hipofisarias y en los niveles séricos de LH y FSH (Teutonico et al., 2012). Es importante mencionar que, al suspender el tratamiento con leuprolide, los efectos del fármaco se revierten rápidamente con la ausencia del mismo (Wilson et al., 2007).

Antecedentes

Obesidad y patología uterina

La obesidad está vinculada a un estado de inflamación crónica, lo que puede ser un factor importante en el desarrollo de enfermedades uterinas. Esta inflamación afecta el endometrio de varias maneras, incluyendo la hiperplasia endometrial, que se refiere al crecimiento excesivo del tejido endometrial y aumenta el riesgo de cáncer endometrial debido a la inflamación persistente, se postulan varios mecanismos a través de los cuales la obesidad incrementa el riesgo de cáncer de endometrio, tales como el aumento de hormonas esteroides endógenas (estrógenos), la resistencia a la insulina, la inflamación crónica y las adipocinas (Kurman & Shih, 2010; Shaw et al., 2016).

Por otro lado, la endometriosis se define por la presencia de glándulas y estroma endometrial fuera de la cavidad uterina, y suele localizarse en la pelvis, los ovarios y las trompas de Falopio. Esta condición puede ser asintomática o manifestarse con síntomas incapacitantes, como dolor pélvico y dismenorrea severa. Además, interfiere con la implantación del embrión y genera inflamación y adherencias en los tejidos adyacentes (Restrepo y Gustavo Adolfo, 2010). Se estima que afecta entre el 2 y el 10% de las mujeres en edad reproductiva y entre el 2 y el 5% de las mujeres posmenopáusicas que están bajo tratamiento hormonal (Gonnella et al., 2024).

La endometriosis es considerada una de las afecciones ginecológicas benignas más comunes y se caracteriza por una inflamación crónica. Existe una correlación entre la obesidad y las etapas más avanzadas de esta enfermedad, aunque la relación de causa y efecto no se ha esclarecido del todo. Por ello, el impacto conjunto de la obesidad y la endometriosis en la función endometrial y la fertilidad continúa siendo incierto (Gonnella et al., 2024).

Enfoques con animales para investigar la obesidad

La obesidad es una condición compleja que requiere un enfoque multidisciplinario debido a sus múltiples dimensiones biológicas, psicológicas, culturales, sociales y ambientales. En este contexto, las ratas Zucker obesas, que desarrollan signos clásicos del síndrome metabólico en humanos, se han convertido en un modelo animal clave en la investigación preclínica, proporcionando una herramienta valiosa para entender este síndrome en humanos, este modelo genético es el más reconocido para estudiar la obesidad (Aleixandre & Miguel, 2008).

En estudios recientes realizados con un modelo de ratón CD-1 inducido a la obesidad mediante una dieta hipercalórica, Wilson et al. (2022) reportaron un aumento en el índice de masa corporal de estos animales, quienes también mostraron una desregulación del estroma endometrial. De manera similar, Gao et al. (2021) llevaron a cabo un estudio en ratones obesos inducidos por una dieta alta en grasas, observando alteraciones en la morfología uterina, que incluyeron la presencia de glándulas quísticas, engrosamiento de la capa estromal y la pérdida de la forma columnar de las células que recubren el endometrio, acompañado de un aumento en las citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α .

En cuanto a la interacción entre los receptores de estrógeno (ER) y la adipogénesis, diversos estudios han evidenciado que estos receptores no solo se localizan en los tejidos reproductivos, sino también en los adipocitos, donde desempeñan un papel crucial en la regulación de la lipogénesis. Se ha sugerido que los estrógenos suprimen la lipogénesis a través de la acción de los receptores ER en los adipocitos, lo que indica una modulación hormonal en el almacenamiento de grasa (Mauvais-Jarvis, 2011). En este contexto, Heine et al. (2000) reportaron que una deficiencia de ER α en el tejido adiposo de ratonas hembra puede desencadenar obesidad sin hiperfagia debido a la atrofia de los adipocitos. En estudios realizados con ratones ICR ovariectomizados (OVX), se observó que la ovariectomía por sí sola provoca un incremento en el peso corporal de los animales, un hallazgo también reportado en ratas por You et al. (2014). Sin embargo, cuando estos animales fueron tratados con un ligando selectivo para el receptor β de estrógenos (C-1), se evidenció un aumento en el peso uterino, así como un incremento en el número y tamaño de las glándulas endometriales (Sasayama et al., 2017).

Adicionalmente, los receptores GPR30, un receptor de membrana acoplado a proteína G para estrógenos, también han sido objeto de investigación. En un estudio realizado por Sharma et al. (2020), ratones obesos inducidos por ovariectomía (OVX) tratados con un agonista de GPER mostraron una reducción significativa en el peso corporal. Estos hallazgos sugieren que la activación de este receptor de membrana podría tener un efecto terapéutico en la obesidad.

En un estudio realizado Shang et al., (2017) con ratas inducidas a la obesidad mediante una dieta alta en grasa (HPO) y tratadas experimentalmente con estradiol (E2), se reportó un aumento en el espesor endometrial, así como en el epitelio glandular y el miometrio uterino. No obstante, también se observaron niveles bajos de adiponectina en estos animales. De manera similar, Weigt et al., (2015) observaron que en ratas obesas Zucker ovariectomizadas (OVX), el tratamiento experimental con E2 en un grupo y con un agonista selectivo del receptor- α en otro grupo lograron contrarrestar la atrofia uterina inducida por la ovariectomía. En otro estudio, realizado Q. Zhang et al., (2009) en ratas obesas Zucker tratadas con E2, se evidenció un aumento en el peso uterino, acompañado de un incremento en la altura del epitelio luminal y una mayor expresión de genes proliferativos, como Ciclina A y c-Myc, especialmente en el tejido endometrial.

Acetato de leuprolide (LEU) y endometrio

LEU introducido en el ámbito clínico en 1985 como alternativa a las terapias con estrógenos y la castración quirúrgica para el tratamiento del cáncer de próstata, LEU ha sido aprobado por la FDA para diversas aplicaciones médicas. Estas incluyen el tratamiento de la endometriosis, la pubertad precoz, las técnicas de fertilización in vitro (FIV), los fibromas uterinos, el síndrome de ovario poliquístico, así como el cáncer de ovario, endometrial y de próstata (Wilson et al., 2007).

El cáncer de endometrio se origina generalmente a partir de células que dependen de hormonas. En este contexto, Bodur Ozturk et al. (2010) encontraron que los agonistas de GnRH, como leuprolide, tienen un efecto directo en este tipo de cáncer al aumentar el índice de apoptosis y reducir la proliferación celular en líneas celulares de adenocáncer endometrial.

La endometriosis es una afección que impacta a un considerable porcentaje de mujeres en edad reproductiva, manifestándose a través de síntomas como dolor pélvico,

dismenorrea y dispareunia. El acetato de leuprolide se ha empleado como tratamiento para esta condición, buscando reducir las lesiones endometriósicas y aliviar los síntomas (Plosker & Brogden, 1994). Si bien este tratamiento ha demostrado ser efectivo, su uso está restringido a un máximo de seis meses. Puede administrarse solo o en combinación con acetato de noretindrona, lo cual ayuda a mitigar la pérdida de densidad mineral ósea. En caso de que los síntomas se reanuden, se puede llevar a cabo un ciclo de retratamiento adicional de seis meses con la misma combinación (Plosker & Brogden, 1994).

Además, se ha propuesto el bazedoxifeno en conjunto con estrógenos conjugados como un tratamiento complementario eficaz al acetato de leuprolide para mujeres premenopáusicas con endometriosis. Esta estrategia evita la estimulación no deseada de las mamas, el sistema nervioso central y el endometrio, y proporciona un efecto protector sobre el sistema esquelético, manteniendo la masa ósea en mujeres posmenopáusicas y restableciendo el flujo de células madre al útero (Hill et al., 2018; Sahin Ersoy et al., 2017).

Zhang et al. (2022) encontraron que el tratamiento con acetato de leuprolide (LEU) incrementa la expresión del gen MIF en mujeres con índice de masa corporal (IMC) ≥ 30 . Dado que el gen MIF (Factor Inhibidor de Macrófagos) está estrechamente relacionado con procesos inflamatorios y metabólicos, especialmente con la obesidad, estos hallazgos sugieren que el tratamiento con LEU podría estar asociado con un aumento de peso adicional en pacientes obesas. El MIF es conocido por su participación en la regulación del metabolismo lipídico y la resistencia a la insulina, factores clave en la patogenia de la obesidad (Matia-García et al., 2014). En este contexto, el aumento en la expresión de MIF podría desencadenar una respuesta metabólica que favorezca el almacenamiento de grasa, lo que potencialmente agravaría la obesidad en mujeres ya afectadas por esta condición. Además, es importante destacar que los efectos del LEU sobre el metabolismo podrían ser diferentes en función del IMC de las pacientes, ya que el tratamiento hormonal tiende a tener un impacto distinto en individuos con obesidad en comparación con aquellos con un peso corporal dentro del rango normal.

Por otro lado, investigaciones previas han observado otros efectos del LEU en mujeres con endometriosis. Weng et al. (2014) reportaron que el tratamiento con LEU promueve

la apoptosis en células epiteliales endometriales eutópicas, inhibiendo la expresión del factor GRP78, conocido por su papel en la regulación del estrés celular. Además, Kim et al. (2014) documentaron una disminución en el volumen uterino de las pacientes tratadas con LEU.

Sin embargo, Usadi et al. (2008) realizaron un estudio en mujeres con ciclos menstruales irregulares, quienes fueron tratadas con LEU y posteriormente administradas con estrógeno exógeno (E2). A través de ecografías transvaginales, examinaron el espesor endometrial de sus úteros y observaron una disminución en el espesor endometrial, aunque este cambio no resultó ser estadísticamente significativo.

El acetato de leuprolide (LEU) ha sido utilizado en diversos estudios en roedores para evaluar sus efectos en diferentes contextos fisiológicos. En un estudio realizado por Kitajima et al. (2006), se administró LEU a ratas con síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO), observando una disminución en los niveles de estradiol (E2) en estos animales. Por otro lado, Olvera-Sandoval et al. (2017) investigaron los efectos de LEU en ratas ovariectomizadas (OVX) y no ovariectomizadas, reportando un aumento en el peso corporal y una expansión en la longitud corporal de las ratas tratadas. Estos efectos fueron atribuidos por los autores a posibles efectos secundarios del fármaco.

Además, LEU ha sido empleado para estudiar el inicio de la pubertad en ratas. En un estudio de Guarraci et al. (2023), se administró LEU a ratas hembra en la etapa postnatal al inicio de la pubertad. Los resultados mostraron un retraso en la apertura vaginal y la interrupción del primer ciclo estral, lo que impidió que la mayoría de las ratas entraran en estró. Sin embargo, al finalizar el tratamiento con LEU y examinar los úteros de las ratas sacrificadas, los autores concluyeron que no hubo efectos a largo plazo sobre el peso uterino en estos animales.

En el contexto de la endometriosis, Goktolga et al. (2015) administraron LEU a ratas inducidas quirúrgicamente con endometriosis y observaron una disminución en el área media de los implantes endometriósicos.

Justificación

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2021, aproximadamente el 39% de las mujeres adultas a nivel global presentaban sobrepeso, y de estas, el 15% padecían obesidad. En México, alrededor del 41% de las mujeres adultas sufren de obesidad, según el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP, 2024). La obesidad tiene un impacto significativo en la fertilidad, incrementando el riesgo de infertilidad; se estima que entre el 30% y el 40% de las mujeres con sobrepeso u obesidad enfrentan dificultades para concebir debido a problemas de ovulación y otras complicaciones relacionadas (Pasquali et al., 2007).

El acetato de leuprolide, empleado en el tratamiento de diversas afecciones médicas, ha demostrado ser efectivo para pacientes con endometriosis (Zhang et al., 2022). Sin embargo, los efectos hipoestrogénicos de este tratamiento sobre la expresión de los receptores de estrógenos ER α y ER β en el útero aún no están completamente esclarecidos, especialmente en mujeres con obesidad (Matsuzaki et al., 2000). Dado que la relación entre infertilidad y obesidad no ha sido suficientemente investigada en el contexto de los tratamientos de fertilidad y sus implicaciones en la expresión de los receptores hormonales, es necesario adoptar un enfoque integral. Por ello, el presente estudio tiene como objetivo evaluar el uso de leuprolide como agonista de GnRH en ratas Zucker obesas y determinar si este tratamiento influye en la expresión de los receptores de estrógenos (ER) en el útero de estos animales.

Pregunta de investigación

¿Cuál es el efecto de la administración subcutánea de acetato de leuprolide sobre los receptores de estrógenos ER α y ER β en el útero de ratas hembra Zucker adultas en etapa reproductiva?

Objetivo general

Determinar el efecto del acetato de leuprolide en la expresión de los receptores ER α y ER β en el útero de ratas hembra Zucker adultas.

Objetivos específicos

1. Evaluar los efectos de la administración de acetato de leuprolide sobre los parámetros zoométricos en la rata Zucker obesa.
2. Determinar si la administración del agonista de GnRH afectar el peso y los parámetros morfológicos del útero de ratas obesas Zucker administradas con LEU.
3. Localizar y cuantificar la presencia de receptores ER α y ER β estrogénicos en el útero de ratas Zucker adultas.

Hipótesis

La administración de acetato de leuprolide, agonista de GnRH, aumenta la expresión de los receptores ER α y ER β en el útero de ratas Zucker obesas.

Metodología

Los animales empleados en este estudio fueron obtenidos y alojados en el Bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices establecidas en la "Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio", así como en las normativas de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y la Ley Mexicana de Protección Animal para la utilización de animales en experimentación (De la Federación, 2001). Se adoptaron medidas para minimizar el sufrimiento de los animales y reducir el número necesario para el proyecto. Además, se siguieron los criterios aprobados por el Comité para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la BUAP en relación con

el manejo y la eutanasia. El protocolo de investigación recibió la aprobación del CICUAL con el folio 100274222-UALVIEP-23/1, fechado el 6 de noviembre de 2023.

Se emplearon un total de 40 ratas de 90 días de edad de dos cepas diferentes: 20 ratas Long-Evans y 20 ratas Obese Zucker Diabetic (OZDF). Los animales se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio, con un ciclo de luz y oscuridad de 12 horas cada uno, acceso libre a alimento y agua. Cada jaula albergaba 4 individuos. El ciclo estral de las ratas se monitoreó a través de la observación de frotis vaginales

Diseño experimental

Los animales, se obtuvieron a los 60 a 70 días de edad y se asignaron aleatoriamente 4 ratas Long-Evans y 4 ratas OZDF a uno de los siguientes grupos experimentales: Control, Vehículo con solución fisiología (0.25 ml/rata), Dosis 1 LEU (1.25 μ g/rata, s.c.), Dosis 2 LEU (2.5 μ g/rata, s.c.), y Dosis 3 LEU (5 μ g/rata, s.c.). La administración del fármaco se llevó a cabo diariamente por vía subcutánea durante 3 días cuando los animales tenían 90 días de edad. El acetato de leuprolide (Sigma-Aldrich, L0399-1MG) se preparó mediante dilución en solución fisiológica estéril para alcanzar una concentración final de 10 μ g/mL. La solución obtenida se almacenó en alícuotas a -20 °C hasta su uso, con el fin de mantener la estabilidad del compuesto. La administración de LEU se realizó según el grupo experimental correspondiente.

Procedimiento de autopsia

Los animales fueron sacrificados mediante una sobredosis de pentobarbital sódico (1ml/rata). Posteriormente, se tomaron los siguientes parámetros morfométricos: (1) Peso corporal: Se utilizó una balanza gramera digital (FUYO, SF-400, con una sensibilidad de 1 g a 10,000 g). El animal se colocó en un recipiente ligero (previamente pesado) para medir su peso en gramos (g). (2) Longitud total: El animal colocado en posición ventral sobre una superficie plana, se midió desde el hocico hasta el extremo de la cola utilizando una cinta métrica graduada en centímetros (cm). (3) Longitud de la cola: En posición ventral, se midió desde el ano hasta el extremo de la cola con una cinta métrica graduada en centímetros (cm). (4) Longitud del cuerpo: Con el animal en posición ventral, se midió desde el hocico hasta el punto de origen de la cola (ano) utilizando una cinta métrica graduada en centímetros (cm). (5) Circunferencia del abdomen: El animal, en posición

dorsal con las patas ligeramente separadas del cuerpo, se midió alrededor de la parte media del abdomen con una cinta métrica graduada en centímetros (cm), ajustándola ligeramente para comprimir el pelaje del cuerpo.

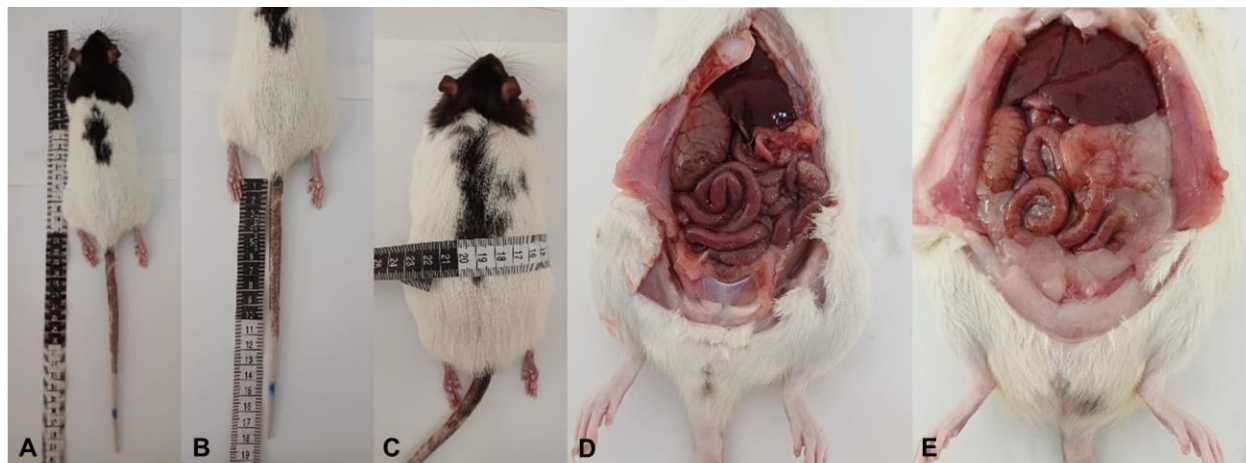


Figura 4. Toma de datos morfométricos. A) Longitud total, B) Longitud de la cola, C) Circunferencia del abdomen, D) Grasa abdominal de Long-Evans, E) Grasa abdominal OZDF

Se procedió a la disección del útero y del tejido adiposo, registrando sus pesos con una balanza de alta precisión (SARTORIUS, CP224S, con sensibilidad de 0.1 mg).

Se calculó el índice de adiposidad de cada animal dividiendo el peso de la grasa pélvica y abdominal por la masa magra (peso total menos el peso de la grasa pélvica y abdominal) de cada organismo.

$$IAC = \frac{\text{Peso grasa pélvica y abdominal}}{\text{Masa magra}}$$

Preparación de muestras

Las muestras del cuerno uterino derecho se fijaron en paraformaldehído al 10% durante 14 a 18 horas. Luego, se lavaron con agua corriente durante 15 minutos y se almacenaron en alcohol al 70°. Para la deshidratación e inclusión del órgano, se realizó un proceso de deshidratación con alcoholes, aclaramiento con xilol, y finalmente se incluyó en bloques con paraplast.

Tabla 1. Procedimiento para la preparación e inclusión de muestras

Procedimiento	Tiempo
Alcohol 70°	1.5 h
Alcohol 90°	1.5 h
Alcohol 96°	2 h
Alcohol 100°	2 h
Xilol	2 h
Baño de parafina	3 h
Colocan el órgano en molde y cubrir con paraplást	Dejar secar toda la noche

Antes de proceder con el corte en el microtomo, se aplicó una capa fina y uniforme de Poly-lisina sobre los portaobjetos para mejorar la adherencia de los cortes. Se realizaron secciones del útero en la región medial con un espesor de 5 μ m. Posteriormente, los portaobjetos se colocaron en una cámara de formol durante al menos 24 horas.

Inmunohistoquímica

Se utilizaron anticuerpos dirigidos contra los receptores de estrógeno α (ER α) y β (ER β). Con el kit comercial de inmunohistoquímica (Santa Cruz Biotechnology, USA), se procesaron un total de 8 portaobjetos por corrida, cada uno conteniendo 8 cortes de la sección medial del útero, junto con los correspondientes controles negativos.

Las secciones fueron desparafinadas y rehidratadas, posteriormente se lavaron con agua destilada y se sometieron a un tratamiento de recuperación de antígeno utilizando Citrato de Sodio 10 mM (pH 6) a 95 °C. Tras enfriar las secciones, se enjuagaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS). La actividad de la peroxidasa endógena fue bloqueada con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 1% en PBS.

Los sueros y anticuerpos se diluyeron en PBS. Las secciones se incubaron durante dos noches con el anticuerpo primario, a una dilución de 1:350 para ER α y 1:350 para ER β . Posteriormente, se realizaron lavados con PBS y se procedió a la incubación del anticuerpo secundario conjugado con biotina, a una concentración de 1 mg/ml, en presencia de 1.5% de suero de bloqueo diluido en PBS.

A continuación, se aplicó un sustrato para peroxidasa y una mezcla de cromógeno (pH 7.6), que contenía buffer sustrato, DAB cromógeno y sustrato de peroxidasa, en agua destilada. Tras el desarrollo de la reacción, las secciones se lavaron, se deshidrataron y se montaron con resina.

Análisis del útero

Los portaobjetos de inmunohistoquímica fueron analizados utilizando un microscopio óptico modelo Olympos BX41. Las imágenes se capturaron con una cámara modelo Evolution VF Digital Camera (Media Cybernetics, Inc., USA), a un aumento de 10x, de tres cortes por portaobjeto de cada animal. Se adquirieron imágenes superpuestas que fueron ensambladas utilizando el software de edición de imágenes Image-Pro Premier 9.3. Una vez ensambladas las micrografías a un aumento de 10x, se trazaron dos líneas perpendiculares para medir dos diámetros: el Diámetro 1 (D1), correspondiente a la mayor longitud, y el Diámetro 2 (D2), correspondiente a la menor longitud. El diámetro promedio se calculó mediante la fórmula siguiente:

$$Diametro\ promedio = \frac{Diametro\ 1\ (D1) + Diametro\ 2\ (D2)}{2}$$

El espesor endometrial se determinó en una sección transversal del útero, midiendo la distancia vertical entre la interfaz endometrio-miometrial y la superficie endometrial. Se posicionaron 20 líneas equidistantes alrededor del endometrio. Estas líneas se trazaron manualmente para cubrir toda la extensión del corte histológico, rotando cada línea 18° hasta completar un total de 20 líneas que atravesen el corte en diferentes ángulos.

Finalmente, se midió el espesor del endometrio y se calculó el promedio de todas las mediciones obtenidas a partir de las líneas trazadas. Todas las mediciones se realizaron utilizando el software Image-Pro.



Figura 5. Secciones transversales del cuerno uterino derecho. A) Análisis del diámetro uterino con líneas perpendiculares. B) Análisis del espesor endometrial con líneas equidistantes

De los cortes mencionados anteriormente, se fotografiaron tres campos seleccionados al azar por cada corte a un aumento de 40x. Se cuantificó el número de células epiteliales nucleares positivas para ER α y ER β en el útero con el software Image-Pro.

Análisis estadístico

Se efectuaron pruebas de normalidad en todos los conjuntos de datos y se consideraron significativas las diferencias estadísticas con una probabilidad inferior a 0.05. Para los datos no paramétricos, se emplearon pruebas, como la prueba de Kruskal-Wallis y el análisis post-hoc de Dunn. En cuanto a los datos paramétricos, se aplicó el análisis de varianza (ANOVA), complementados con las pruebas post-hoc de Tukey. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el software RStudio.

Resultados

Parámetros zoométricos

- Peso corporal

Las ratas Zucker control presentaron un mayor peso corporal en comparación con los animales delgados sin tratamiento. El tratamiento con LEU no modificó el peso corporal tanto en los animales delgados como en los obesos (Figura 5)

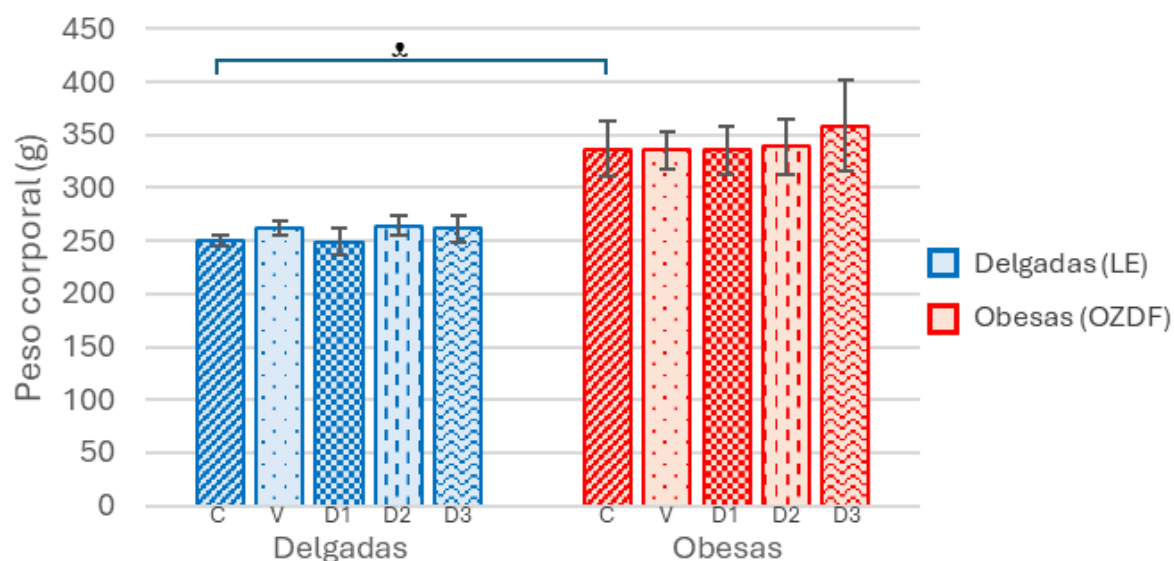


Figura 6. Media \pm e.e.m del peso corporal (g) de ratas Long-Evans (Delgadas) y OZDF (Obesas) en los distintos grupos experimentales. C=Control, V=Vehículo, D1= dosis 1, D2= dosis 2, D3= dosis 3. Todos los grupos tuvieron una n=4. Los datos se analizaron con una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Tukey, Control LE vs OZDF ($p=0.0072$ *).

- Peso de la grasa abdominal y pélvica

Las ratas Zucker presentaron una mayor acumulación de grasa en comparación con las ratas Long-Evans. Sin embargo, la administración de LEU no modificó este parámetro en el resto de los grupos experimentales (Figura 6).

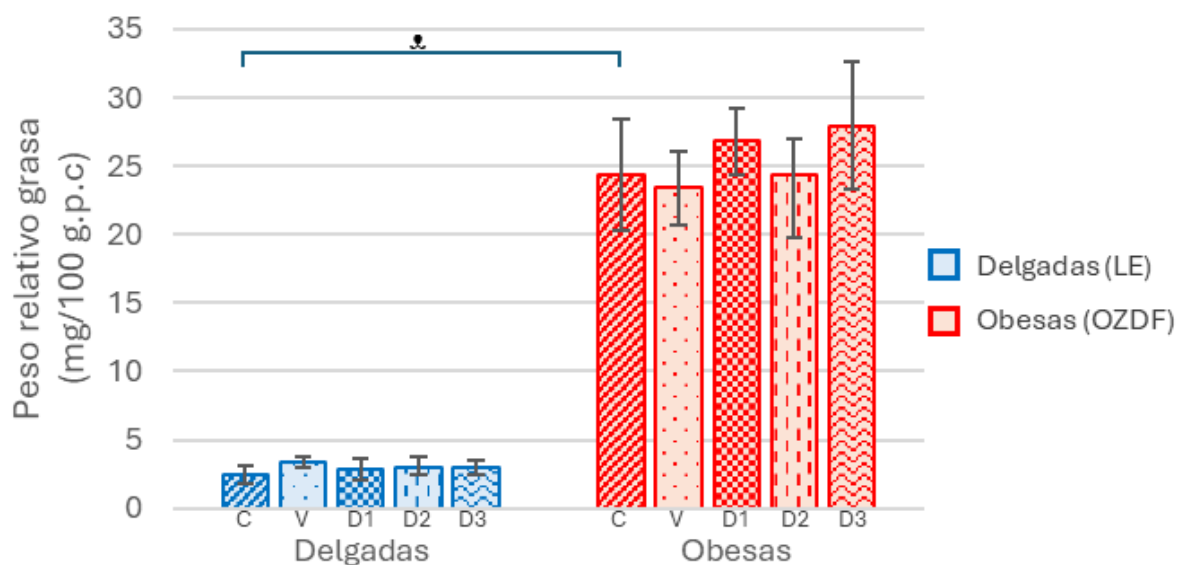


Figura 7. Media \pm e.e.m del peso relativo de la grasa abdominal y pélvica (mg/100 g.p.c) de ratas Long-Evans (Delgadas) y OZDF (Obesas) en los distintos grupos experimentales. C=Control, V=Vehículo, D1= dosis 1, D2= dosis 2, D3= dosis 3. Todos los grupos tuvieron una n=4. Los datos se analizaron con un prueba Kruskal-Wallis seguidas de la prueba de Dunn, LE vs OZDF ($p=0.0090$ \ast).

- Índice de adiposidad

Los animales delgados sin tratamiento presentaron índices de adiposidad considerablemente reducidos en comparación con las ratas obesas del grupo control. No obstante, la aplicación de LEU no altero esta variable tanto en individuos delgados como en los obesos (Figura 7).

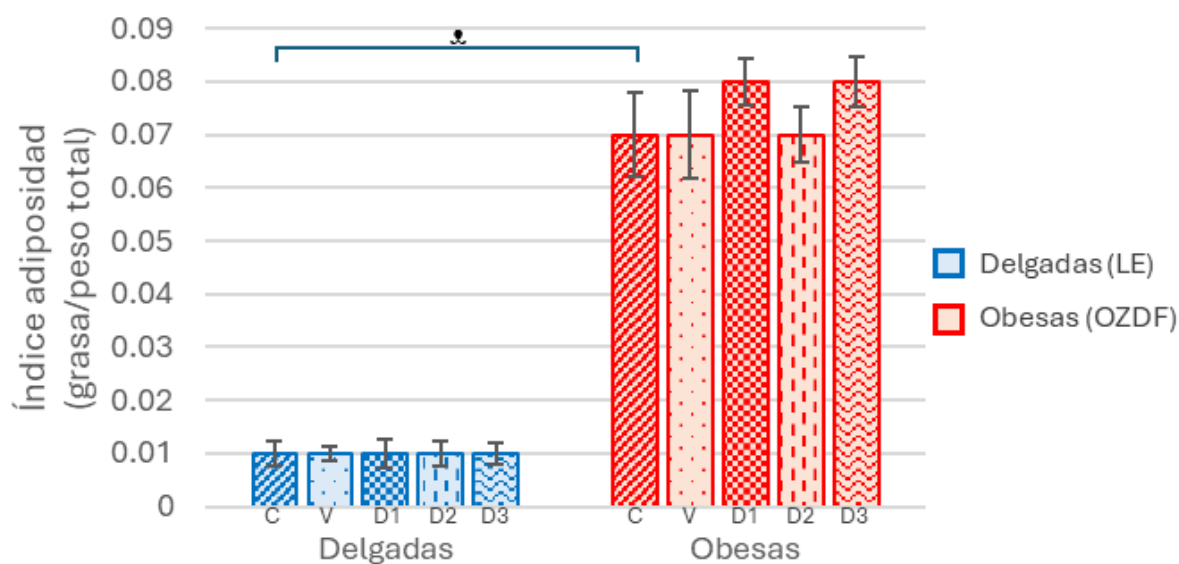


Figura 8. Media \pm e.e.m del índice de adiposidad (grasa/ peso corporal) de ratas Long-Evans (Delgadas) y OZDF (Obesas) en los distintos grupos experimentales. C=Control, V=Vehículo, D1= dosis 1, D2= dosis 2, D3= dosis 3. Todos los grupos tuvieron una n=4. Los datos se analizaron con una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Tukey, Control LE vs OZDF ($p=0.000077$ \ast)

- Peso útero

Las ratas Zucker sin administración de LEU presentaron un peso uterino significativamente menor en comparación con las ratas delgadas no tratadas con el fármaco. Por otro lado, las ratas Long-Evans tratadas con la dosis 1 (1.25 μg) mostraron diferencias significativas respecto al grupo Control y al grupo Vehículo, evidenciando que la administración de LEU indujo una disminución en el peso relativo del útero (Figura 8).

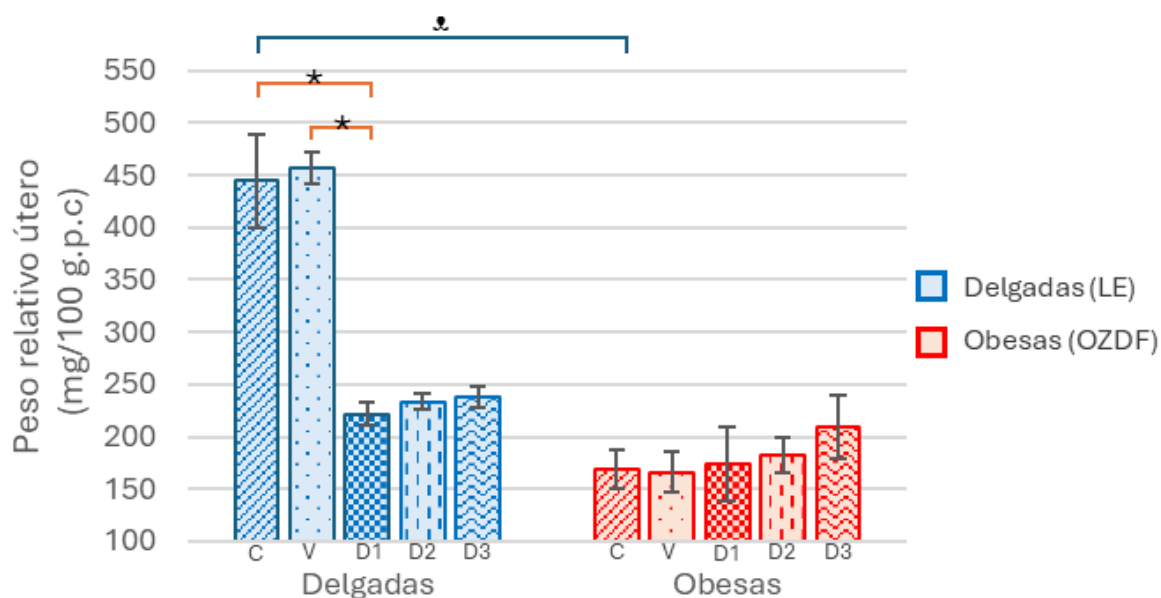


Figura 9. Media \pm e.e.m del peso relativo del útero (mg/100 g.p.c de ratas Long-Evans (Delgadas) y OZDF (Obesas) en los distintos grupos experimentales. C=Control, V=Vehículo, D1= dosis 1, D2= dosis 2, D3= dosis 3. Todos los grupos tuvieron una n=4. Los datos se analizaron con una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Tukey, Control LE vs OZDF ($p=0.0005$ \bullet). Además, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn, LE Control vs Dosis 1 ($p=0.0264^*$), LE Vehículo vs Dosis 1 ($p=0.0228^*$).

Parámetros histológicos

- Morfología del útero

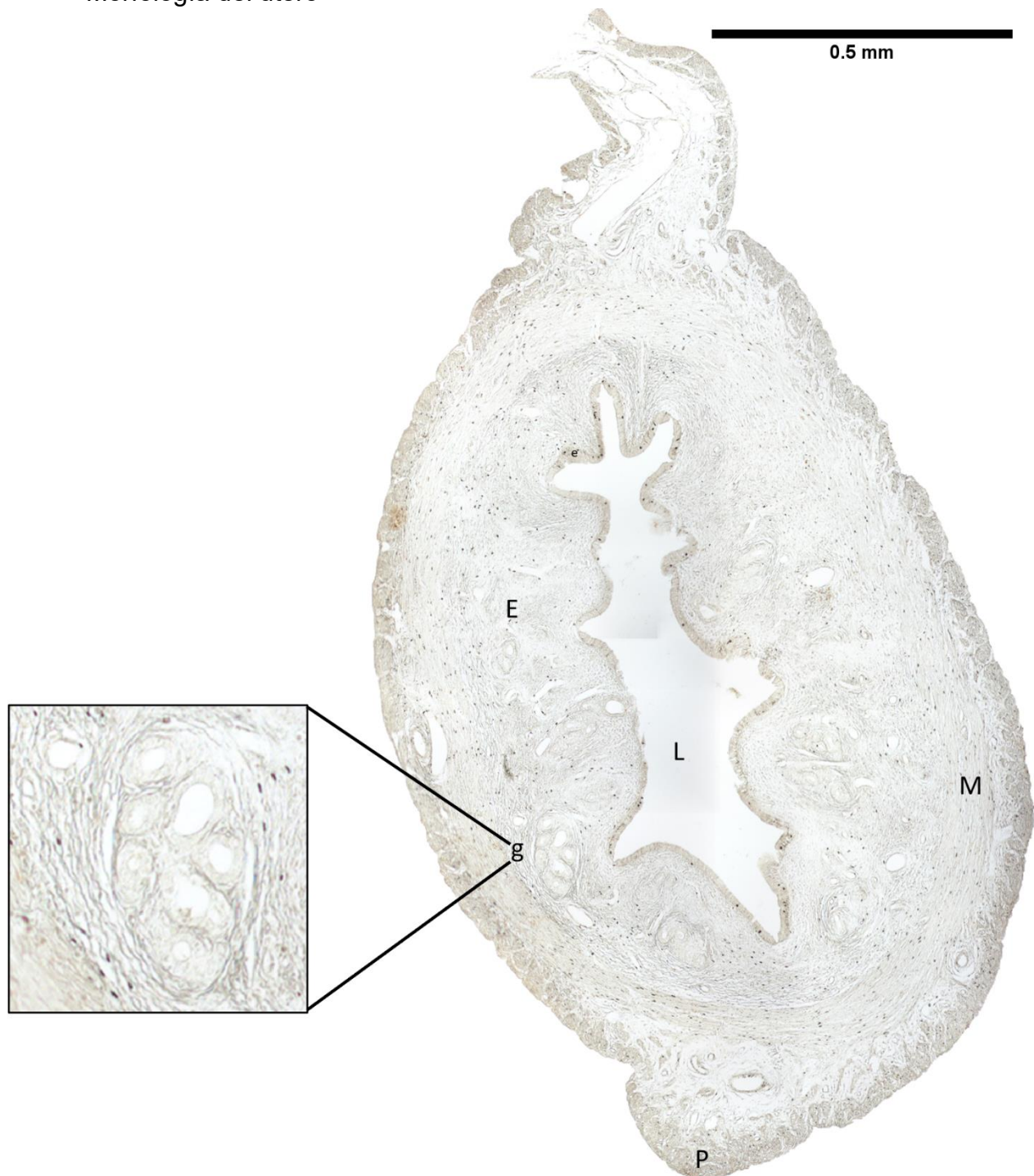


Figura 10. Sección transversal del cuerno uterino derecho. P- Perimetrio; M- Miometrio; E- Endometrio; L- Luz; E- epitelio; G- glándulas uterinas. Aumento x100



Figura 11. Secciones transversales del cuerno uterino derecho: A) de la rata Long-Evans y B) rata Zucker. Aumento x100

- Diámetro uterino

En ratas Long-Evans tratadas con leuprolide (LEU) en dosis de 1.25 μ g y 2.5 μ g, se observó una disminución del diámetro uterino en comparación con los grupos control y vehículo. Sin embargo, la administración de 5 μ g de LEU no produjo cambios significativos en el diámetro uterino, manteniéndolo similar al del grupo control, sin evidenciar una afectación notable por el fármaco. En ratas obesas, la dosis de 2.5 μ g de LEU también redujo el diámetro uterino de los animales. No obstante, al igual que en las ratas de peso normal, la dosis más alta no causó alteraciones y el diámetro uterino se mantuvo igual al del grupo control (Figura 11).

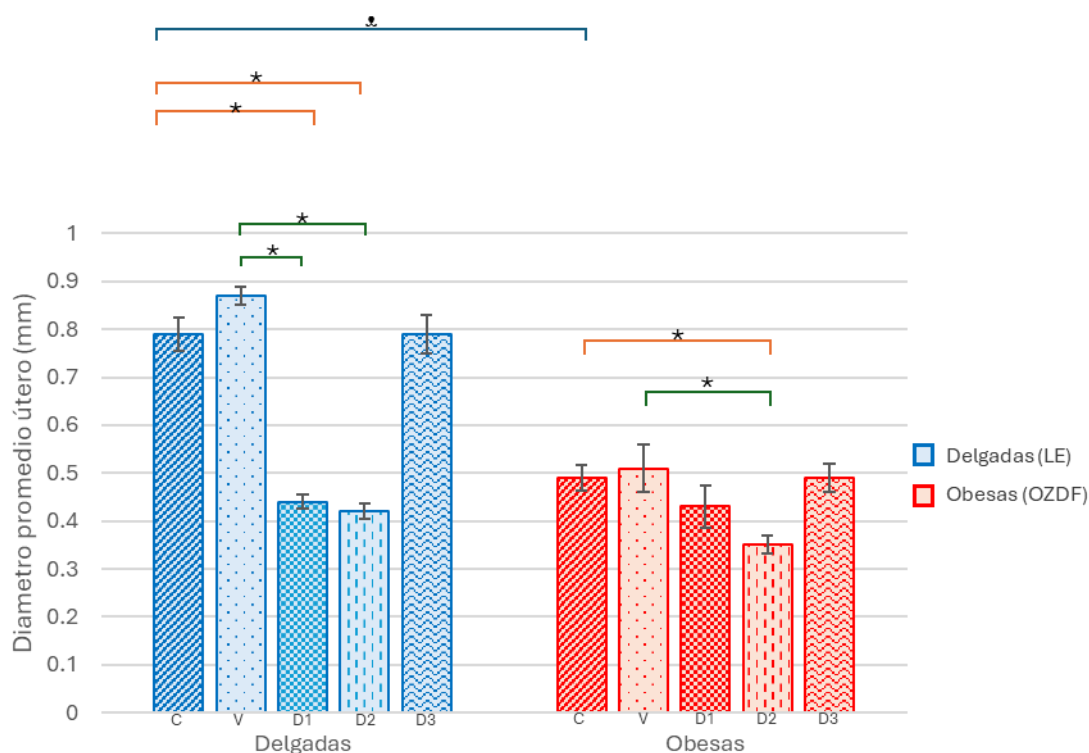


Figura 12. Media \pm e.e.m del diámetro promedio del útero (mm) ratas Long-Evans (Delgadas) y OZDF (Obesas) en los distintos grupos experimentales. C=Control, V=Vehículo, D1= dosis 1, D2= dosis 2, D3= dosis 3. Todos los grupos tuvieron una n=4. Los datos se analizaron con una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Tukey, Control LE vs OZDF ($p= 0.0000126$ α). Se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn, LE Control vs Dosis 1 ($p=0.0086^*$), LE Control vs Dosis 2 ($p=0.0014^*$), LE Vehículo vs Dosis 1 ($p=0.0008^*$), LE Vehículo vs Dosis 2 ($p=0.0001^*$); OZDF Control vs Dosis 2 ($p=0.0363^*$), OZDF Vehículo vs Dosis 2 ($p=0.0254^*$)

- Espesor endometrial

En ratas delgadas tratadas con leuprolide, se observó que la administración de cualquier dosis disminuyó el espesor endometrial, siendo la dosis de 1.25 μ g la que menos impacto tuvo en comparación con las demás dosis administradas. En ratas obesas, aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas, la administración de leuprolide sí modificó el espesor endometrial en los distintos grupos experimentales (Figura 12).

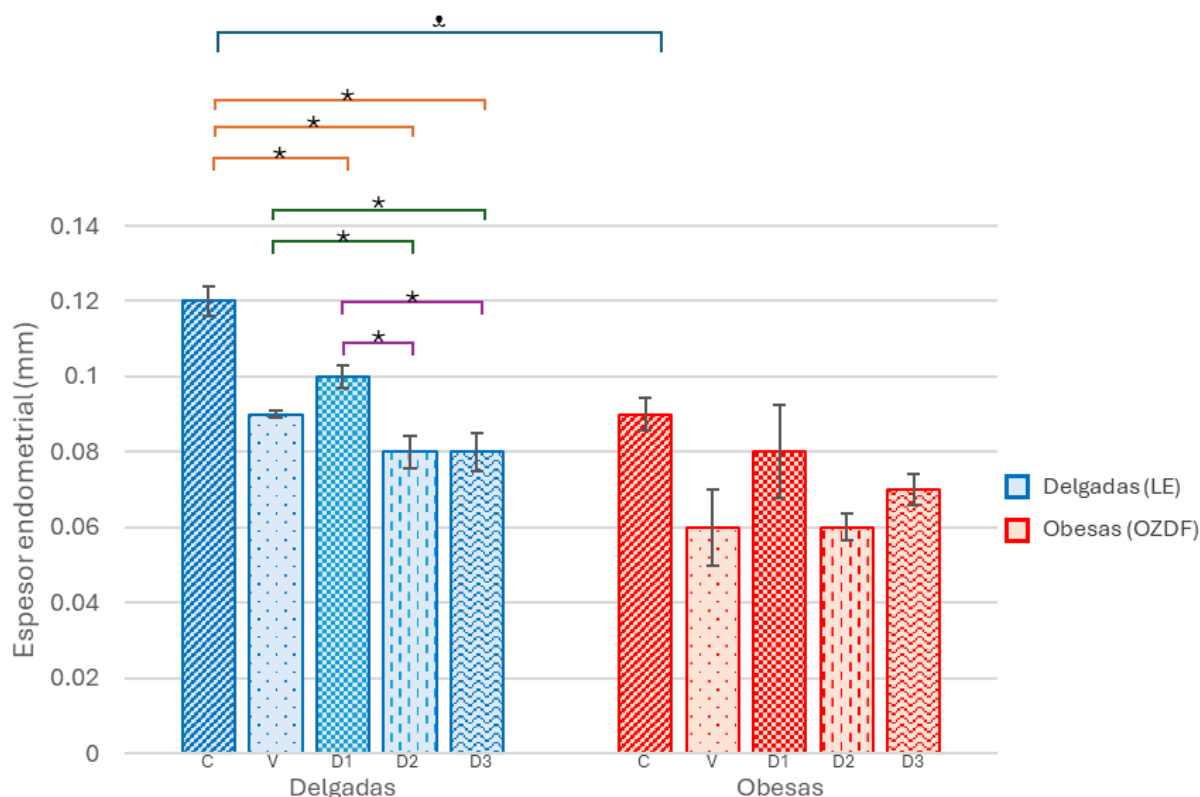


Figura 13. Media \pm e.e.m del espesor endometrial del útero (mm) de Long-Evans (Delgadas) y OZDF (Obesas) en los distintos grupos experimentales. C=Control, V=Vehículo, D1= dosis 1, D2= dosis 2, D3= dosis 3. Todos los grupos tuvieron una n=4. Los datos se analizaron con una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Tukey, Control LE vs OZDF ($p= 0.0000657$ α). Se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn, LE Control vs Dosis 1 ($p=0.00045^*$), LE Control vs Dosis 2 ($p= 0.00000^{**}$), LE Control vs Dosis 3 ($p=0.00000^{**}$), LE Vehículo vs Dosis 2 ($p=0.0267^*$), LE Vehículo vs Dosis 3 ($p=0.0062^*$), LE Dosis 1 vs Dosis 2 ($p=0.017^*$), LE Dosis 1 vs Dosis 3 ($p=0.0038^*$).

Inmunohistoquímica

Presencia del receptor ER α

- Marcaje

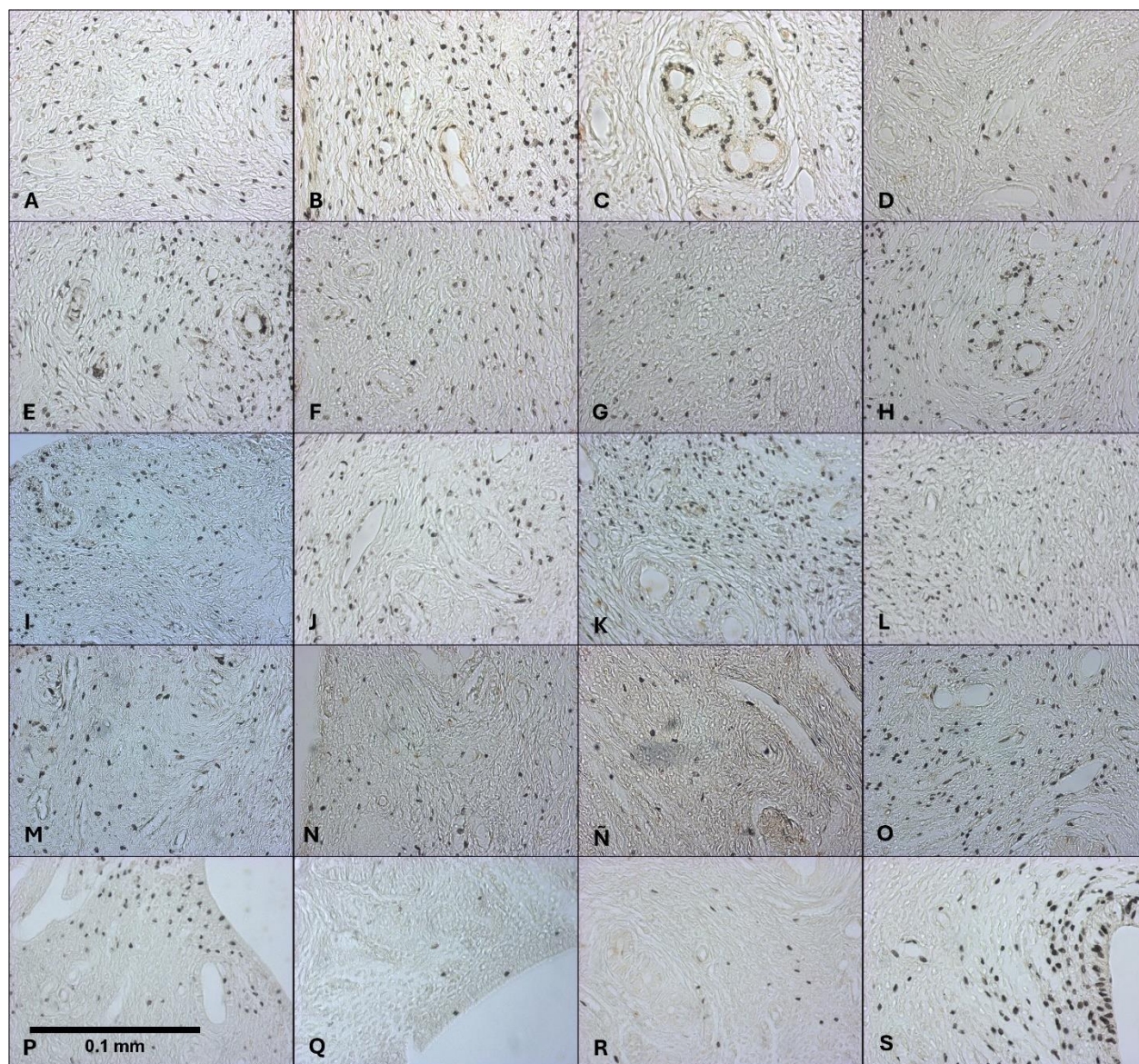


Figura 14. Inmunohistoquímica de ER α en sección medial del útero en ratas Long-Evans. A-D) Control; E-H) Vehículo; I-L) Dosis 1; M-O) Dosis 2; P-S) Dosis 3. Aumento x400

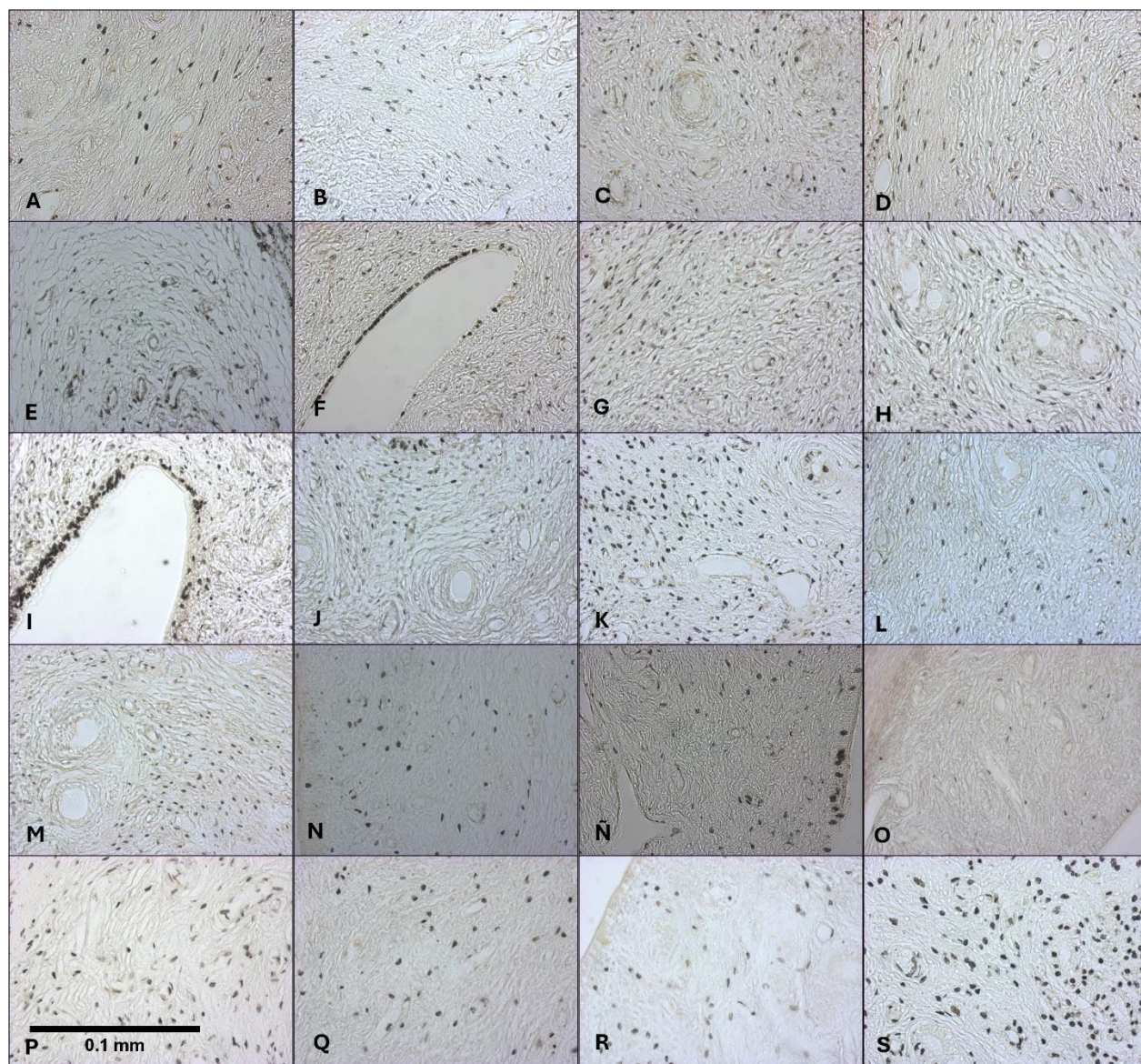


Figura 15. Inmunohistoquímica de ER α en sección medial del útero en ratas Zucker. A-D) Control; E-H) Vehículo; I-L) Dosis 1; M-O) Dosis 2; P-S) Dosis 3. Aumento x400

- Cuantificación

El número de marcas del receptor de estrógenos alfa (ER α) en ratas Long-Evans aumentó significativamente cuando se les administró leuprolide en dosis de 1.25 μ g en comparación con el grupo control. Sin embargo, al administrarse la dosis de 5 μ g, la cantidad de marcas presentes en el útero disminuyó. Cabe resaltar que la dosis más baja (1.25 μ g) fue la que mostró un mayor número de marcas del receptor ER α en estos animales.

En ratas Zucker, la administración de leuprolide en dosis de 1.25 μ g también incrementó el número de marcas en comparación con el grupo vehículo, y aunque la dosis de 5 μ g también mostró un aumento, este no fue estadísticamente significativo. (Figura 15).

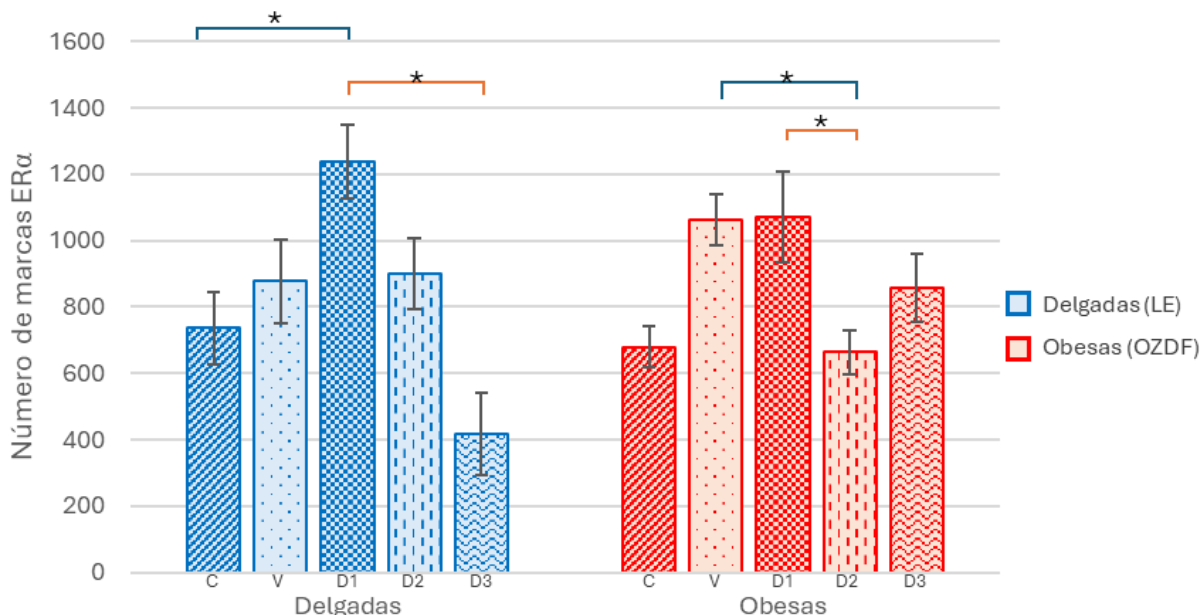


Figura 16. Media \pm e.e.m del número de marcaje de ER α en el tejido uterino de ratas Long-Evans (Delgadas) y OZDF (Obesas) en los distintos grupos experimentales. C=Control, V=Vehículo, D1= dosis 1, D2= dosis 2, D3= dosis 3. Todos los grupos tuvieron una n=4. Los datos se analizaron con una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Tukey, LE Control vs Dosis 1 ($p=0.0517^*$), LE Dosis 1 vs Dosis 3 ($p=0.001225^*$); OZDF Dosis 1 vs Dosis 2 ($p=0.05006^*$), OZDF Vehículo vs Dosis 2 ($p=0.05664^*$)

Presencia del receptor ER β

- Marcaje

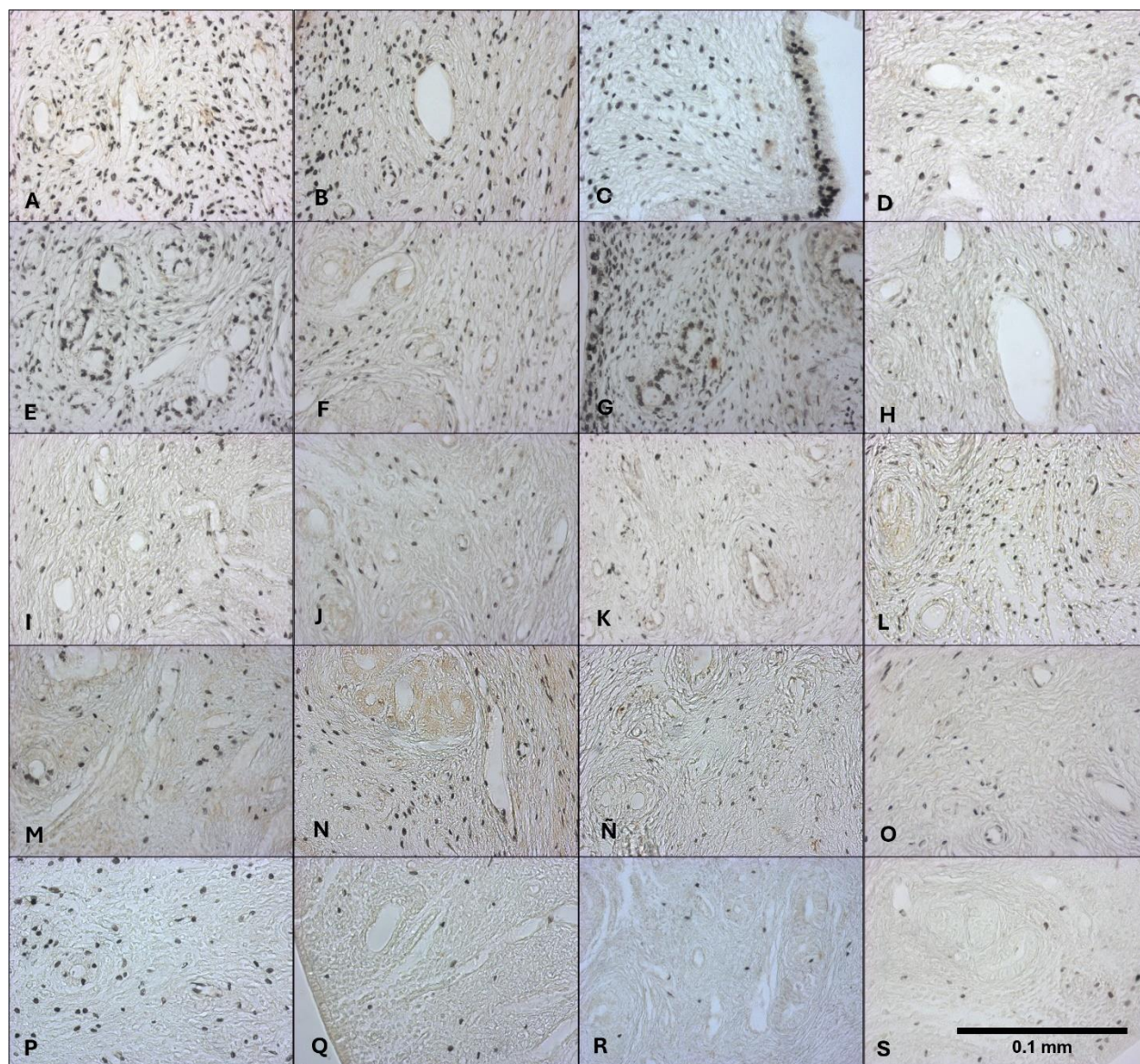


Figura 17. Inmunohistoquímica de ER β en sección medial del útero en ratas Long-Evans. A-D) Control; E-H) Vehículo; I-L) Dosis 1; M-O) Dosis 2; P-S) Dosis 3. Aumento x400

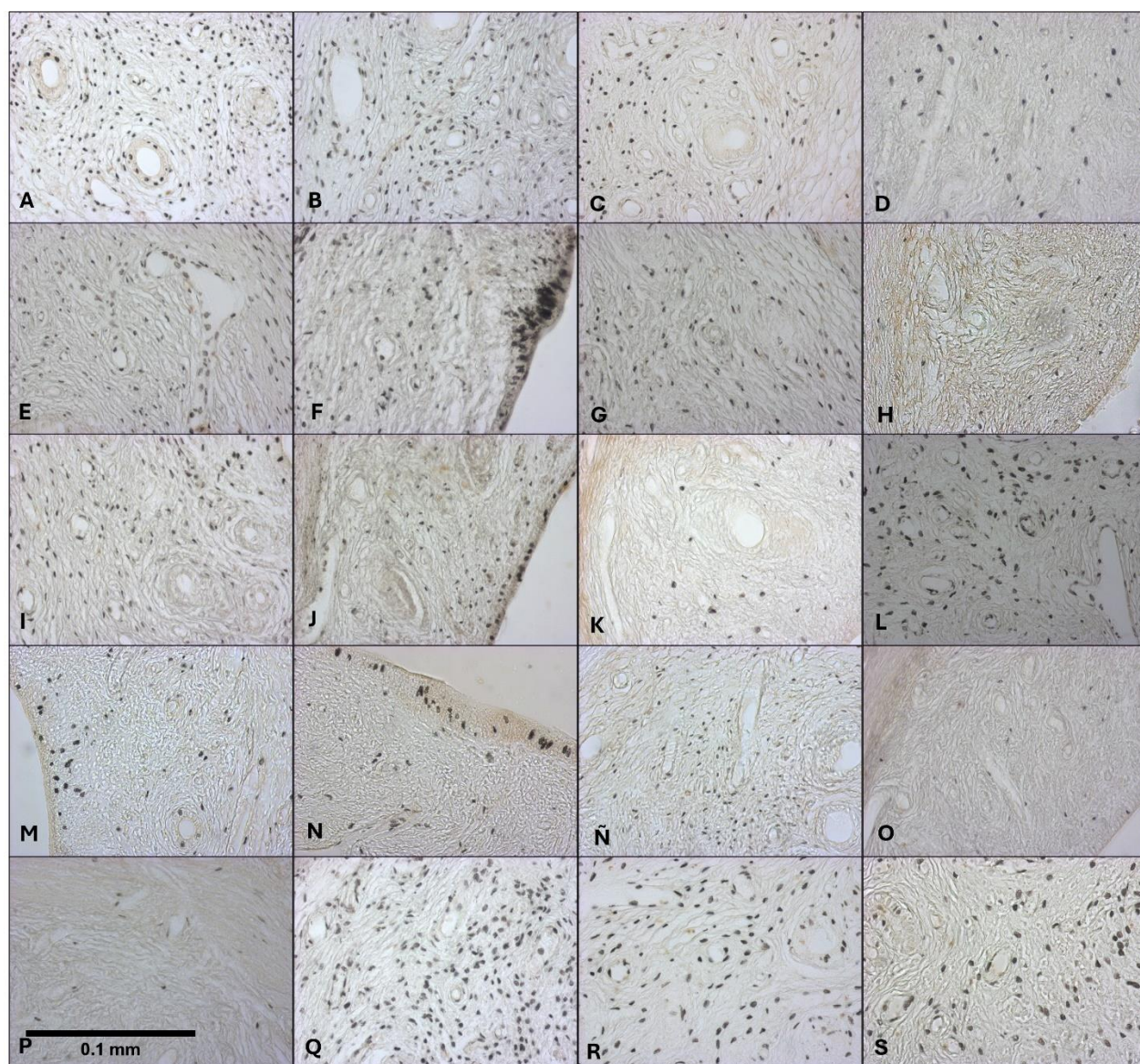


Figura 18. Inmunohistoquímica de ER β en sección medial del útero en ratas Zucker. A-D) Control; E-H) Vehículo; I-L) Dosis 1; M-O) Dosis 2; P-S) Dosis 3. Aumento x400

- Cuantificación

El tratamiento con leuprolide en ratas delgadas redujo la cantidad de marcas de receptores de estrógenos beta ($ER\beta$) en comparación con los grupos control y vehículo. En ratas obesas, leuprolide también disminuyó el marcaje del receptor beta, reduciendo la cantidad presente en el tejido uterino. Sin embargo, la dosis de 2.5 μ g fue la que produjo la mayor disminución en la cantidad de marcas, mientras que la dosis más alta (5 μ g) no mostró una reducción tan drástica en comparación con la dosis de 2.5 μ g.

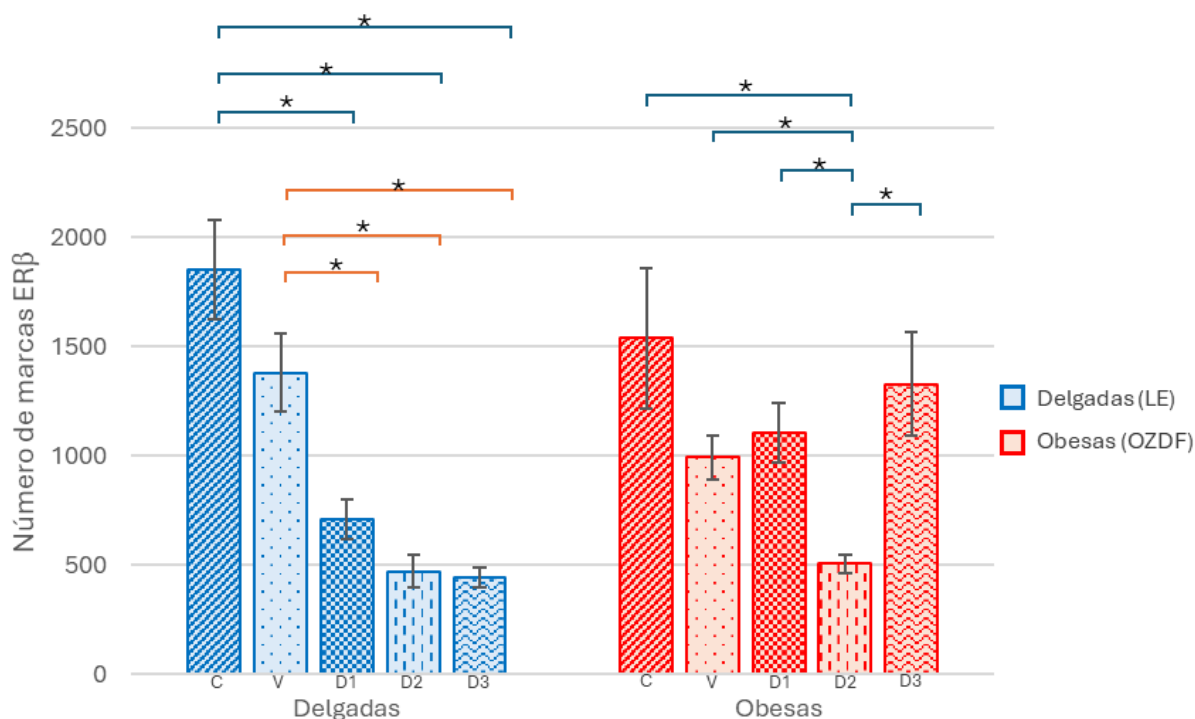


Figura 19. Media \pm e.e.m del número de marcaje de $ER\beta$ en el tejido uterino de ratas Long-Evans (Delgadas) y OZDF (Obesas) en los distintos grupos experimentales. C=Control, V=Vehículo, D1= dosis 1, D2= dosis 2, D3= dosis 3. Todos los grupos tuvieron una n=4. Los datos se analizaron con una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Tukey, LE Control vs Dosis 1 ($p=0.0010609^*$), LE Control vs Dosis 2 ($p=0.0000208^{**}$), LE Control vs Dosis 3 ($p=0.0000146^{**}$); OZDF Control vs Dosis 2 ($p=0.0005962^{**}$), OZDF Vehículo vs Dosis 2 ($p=0.0277606^*$), OZDF Dosis 1 vs Dosis 2 ($p=0.0102177^*$), OZDF Dosis 2 vs Dosis 3 ($p=0.0021099^*$)

Discusión

En este estudio se evidencia, por primera vez, la presencia de receptores estrogénicos ER α y ER β en el útero de ratas obesas, utilizando técnicas de inmunohistoquímica. Aunque la obesidad no parece modificar la expresión de estos receptores, sí se asocia con una reducción en el peso y diámetro del útero, así como en el grosor del endometrio, lo que sugiere un efecto estructural adverso independiente de la señalización estrogénica. Por otra parte, el tratamiento con un agonista de GnRH no produjo aumentos en la expresión de los receptores estrogénicos, salvo en el caso de la dosis más baja, la cual provocó un aumento en la expresión del receptor ER α , indicando una posible acción estimulante a bajas concentraciones del fármaco.

Para este trabajo se utilizaron ratas Zucker obesas que constituyen un modelo experimental de obesidad genética que comparte diversas características con el síndrome metabólico en humanos. Este modelo no solo presenta la obesidad como su principal característica, sino que también exhibe alteraciones endocrinas comunes en los pacientes humanos con esta condición (Aleixandre & Miguel, 2008). En las ratas Zucker obesas, la disfunción en la señalización de leptina impide la regulación adecuada del peso corporal, resultando en un estado de obesidad (Mauvais-Jarvis, 2011).

En este contexto, nuestros resultados respaldan la existencia de esta alteración, ya que observamos un aumento significativo en el peso corporal, así como en la grasa abdominal y pélvica, y en el índice de adiposidad, en comparación con las ratas Long-Evans, las cuales no presentan esta mutación genética.

Por otro lado, las ratas obesas Zucker, presentan úteros más pequeños en comparación con las ratas delgadas, lo que se atribuye a una disminución de la estrogenización en las ratas obesas (Bray et al., 1976). En nuestro estudio, observamos una reducción en el peso y diámetro uterino, así como en el espesor endometrial en los animales obesos en comparación con ratas delgadas, lo que respalda la hipótesis de que la obesidad ejerce efectos negativos directos sobre la salud uterina. Este fenómeno está relacionado con las alteraciones hormonales propias de la obesidad, que incluyen una menor producción de hormonas estrogénicas por parte de los ovarios. Específicamente, se postula que en las ratas obesas, la producción ovárica de hormonas estrogénicas es menor en

comparación con las ratas delgadas (Bray et al., 1976), lo que contribuye a los cambios en el peso y la morfología uterina observados en este trabajo.

En nuestro laboratorio hemos demostrado que la rata Zucker obesa presenta concentraciones elevadas de estradiol (Puga y Colmenares et al., 2021), lo que nos llevó a plantear la hipótesis de que la disminución en el peso uterino podría estar asociada a alteraciones en la expresión de los receptores estrogénicos. Asimismo, se consideró que el tratamiento con un agonista de GnRH podría favorecer el crecimiento uterino mediante la modulación del eje hormonal.

Sin embargo, los resultados obtenidos no respaldan esta hipótesis, ya que no se observó un incremento significativo en el tamaño del útero tras la administración del tratamiento. Esto sugiere que otros mecanismos podrían estar involucrados en la regulación del desarrollo uterino en este modelo de obesidad. Una posible explicación alternativa es la disfunción en la señalización de moléculas como la kisspeptina y su receptor, los cuales han sido implicados en el desarrollo y mantenimiento del útero durante la adultez (Babwah et al., 2015). En apoyo a esta posibilidad, León et al. (2016) demostraron que ratonas knockout para la kisspeptina y su receptor presentan una reducción del 81% en el crecimiento uterino en etapa adulta.

Estos hallazgos abren una nueva línea de investigación orientada a evaluar si, en la rata Zucker obesa, una alteración en la vía de señalización de la kisspeptina podría estar contribuyendo al desarrollo incompleto del útero.

En el marco de nuestra investigación, observamos una disminución significativa en el diámetro uterino y el espesor endometrial en ratas obesas tratadas con LEU. Los resultados obtenidos en este estudio destacan la estrecha relación entre el diámetro y el peso uterino, los cuales están significativamente influenciados por factores hormonales. Un hallazgo particularmente relevante fue que la administración de 5 μg de LEU produjo un efecto más pronunciado, aunque no estadísticamente significativo, al incrementar tanto el peso como el diámetro uterino en ratas obesas, las cuales presentan alteraciones metabólicas importantes. Por otra parte, se observó una modificación en el espesor endometrial con la dosis de 2.5 μg , lo cual sugiere una posible sensibilidad diferencial del tejido endometrial a dosis moderadas del agonista. No obstante, es importante destacar que la menor reducción en el espesor endometrial se registró con la dosis más alta

evaluada, lo que podría indicar un efecto atenuado del tratamiento a concentraciones elevadas, posiblemente relacionado con mecanismos de retroalimentación o desensibilización del receptor. Estos resultados sugieren que el acetato de leuprolide, a dosis específicas, podría ejercer un efecto modulador sobre la fisiología uterina, independientemente de la condición metabólica de los animales, destacando la importancia de la dosificación en los efectos observados.

La administración prolongada de agonistas de GnRH, como LEU, induce una regulación negativa a nivel hipofisario, lo que reduce la liberación de gonadotropinas (Filindris et al., 2024). Este efecto tiene un impacto en la esteroidogénesis de las células de la teca y granulosa en el ovario, alterando la regulación de la receptividad endometrial, la proliferación celular y las vías apoptóticas en el útero, actuando de forma similar a un antagonista (Gambineri et al., 2019). En un estudio realizado por Suszka-Świtek et al. (2012), se administró un agonista de GnRH a ratas delgadas durante un período de 10 días y a dosis altas. Los resultados mostraron una disminución en el peso uterino, lo que sugiere que la disfunción hormonal, como la inhibición de GnRH, genera una desregulación en la producción de hormonas sexuales. Esta alteración hormonal conlleva a una reducción en el grosor y la vascularización del endometrio, lo que finalmente provoca una disminución en el peso del útero en animales delgados. En el ámbito clínico, estudios en mujeres tratadas con LEU, también han reportado una disminución en el volumen uterino (Kim et al., 2014), lo que refuerza la idea de que la disfunción hormonal, al igual que en el modelo animal, puede alterar la morfología del útero.

Estudios previos han mostrado que, en ratas con obesidad inducida por una dieta alta en grasas, la estimulación con E2 aumenta el espesor endometrial, así como la proliferación del epitelio glandular y del miometrio (Shang et al., 2017). También se ha reportado un aumento en el estroma y los vasos (Español et al., 2022). De manera similar, en ratas con síndrome de ovario poliquístico (SOP) tratadas con un agonista de los receptores de estrógenos (ER), se ha observado un incremento en el espesor de la pared uterina y en la cantidad de células epiteliales debido al exceso de E2 (Mirabolghasemi & Kamyab, 2017). En modelos de ratas Zucker obesas, la estimulación con E2 ha mostrado un aumento en la altura del epitelio luminal uterino (Q. Zhang et al., 2009). En otros modelos experimentales, como en ratones con obesidad, se ha reportado una desregulación del

estroma endometrial (M. R. Wilson et al., 2022). En mujeres con ciclos menstruales irregulares tratadas con LEU y E2, los estudios ecográficos mostraron una reducción del espesor endometrial, aunque este cambio no fue significativo (Usadi et al., 2008).

Sin embargo, nuestros resultados sugieren que LEU pudo haber actuado como un antagonista a nivel hipofisario, provocando la desensibilización de los receptores hipofisarios e inhibiendo la liberación de gonadotropinas, lo cual explica los resultados contradictorios observados en nuestro estudio.

El comportamiento observado en los datos obtenidos podría explicarse por el hecho de que los animales fueron sacrificados durante la fase secretora del ciclo uterino, cuando los niveles de E2 son más bajos en comparación con la P4 (Dias Da Silva et al., 2024). No obstante, en las ratas Zucker, este efecto podría no haber sido tan pronunciado, ya que su tejido adiposo, propio de la obesidad, tiene una mayor capacidad para sintetizar y liberar E2 (Gambineri et al., 2019). Este mecanismo podría haber modulado parcialmente el efecto inhibitor de LEU. En conjunto, estos resultados destacan la complejidad de la interacción entre los tratamientos hormonales, la obesidad y la regulación del útero.

En nuestro estudio, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de marcas de receptores de estrógenos alfa ($ER\alpha$) en el tejido uterino entre ratas delgadas intactas y obesas intactas.

En las ratas obesas, se observó una disminución en la expresión de los receptores estrogénicos alfa ($ER\alpha$) tras la administración de una dosis de 2.5 μ g de LEU. En contraste, la dosis de 1.5 μ g indujo un aumento en la cantidad de receptores detectados en el tejido uterino, efecto que también se evidenció con la dosis de 5 μ g, aunque este último incremento no alcanzó significancia estadística en comparación con la dosis más baja. Estos resultados sugieren que la relación entre la dosis de LEU y la expresión de los receptores $ER\alpha$ no es lineal, y podría estar modulada por factores como la sensibilidad diferencial del tejido uterino a los estrógenos, así como por mecanismos de regulación específicos del modelo experimental utilizado.

Las ratas obesas, debido a sus alteraciones metabólicas y hormonales, podrían experimentar una mayor regulación compensatoria de los receptores de estrógenos $ER\alpha$ en respuesta a la administración de 2.5 μ g de LEU. Al reducirse los niveles de estrógenos

por la inhibición de GnRH por LEU, los tejidos uterinos de las ratas obesas podrían intentar contrarrestar esta deficiencia aumentando la expresión de los receptores para captar más estrógenos disponibles.

El receptor ER α desempeña un papel clave en la promoción de la proliferación celular uterina (K. Yu et al., 2022). La reducción de su expresión podría estar asociada con una retroalimentación negativa inducida por una baja disponibilidad de estrógenos, tal como sugieren Hojnik et al. (2023). Los receptores ER α son esenciales para la proliferación y el crecimiento en tejidos dependientes de estrógenos, y su disminución podría reflejar una respuesta atenuada a los estrógenos, especialmente en el contexto de la inhibición hormonal mediada por LEU. En apoyo a esta hipótesis, un estudio de Nephew et al. (2000) observó que la inyección de estradiol en ratas adultas delgadas aumentaba la expresión de ER α a las 24 horas de su administración, lo que sugiere que tanto la regulación negativa de ER α en los epitelios como la regulación positiva en el estroma son fundamentales para los eventos tempranos de proliferación celular inducida por E2. Otros estudios, como el de Xiaoqin Ye (2020), también han señalado que los receptores ER α controlan la proliferación epitelial en respuesta a la estimulación por E2, lo que puede explicar los efectos observados en el estudio de Nephew et al. (2000).

Nuestros resultados también revelaron una disminución en la expresión del receptor estrogénico beta (ER β) en el tejido uterino de las ratas Zucker tras la administración de LEU, siendo particularmente significativa con la dosis de 2.5 μ g. Este hallazgo sugiere que la modulación de la expresión de ER β podría estar influenciada por el tratamiento, ya que la acción supresora de LEU sobre los niveles de estrógenos podría intensificar la disminución de ER β a través de mecanismos de retroalimentación negativa.

Los bajos niveles de estrógenos en el organismo podrían no ser suficientes para mantener la expresión de ER β en el útero de estas ratas, ya que ER β podría ser más sensible a la falta de estrógenos, lo que llevaría a su reducción.

Esto apunta a una interacción compleja entre el tratamiento farmacológico y el ambiente hormonal alterado de los animales obesos, que podría tener implicaciones relevantes en la capacidad de respuesta del tejido uterino a la señalización estrogénica.

Stygar et al. (2003) informaron que el tratamiento con un agonista endometrial incrementó la expresión de ARNm de ER β en el útero de ratas hembra adultas delgadas, sugiriendo

que la estimulación directa podría inducir la expresión de ER β en los tejidos uterinos. De manera similar, Sar y Welsch (1999) realizaron un estudio en ratas en edad reproductiva, donde reportaron la presencia exclusiva de ER β en las células de la granulosa del ovario. Este hallazgo implica que los efectos del estrógeno endógeno en la regulación del crecimiento y la maduración de los folículos ováricos están mediados por ER β . La expresión de ER β en el ovario puede estar asociada con una acción local de los estrógenos en dicho órgano, sugiriendo que los efectos estrogénicos en el útero están regulados de manera similar.

En cuanto a la dosis de 2.5 μ g de LEU, esta dosis ha sido utilizada previamente por Patel y Shah (2018), quienes administraron LEU a ratas hembra adultas, reportando una mejora en el desarrollo folicular, lo que podría tener implicaciones para la mejora de la fertilidad en el contexto del síndrome de ovario poliquístico (SOP).

Es relevante destacar que no se han reportado en la literatura dosis de 1.5 μ g ni 5 μ g de LEU en estudios previos, y no existe evidencia que sugiera que estas dosis sean empleadas para tratar afecciones reproductivas. La ausencia de estudios con estas dosis podría explicarse por la variabilidad en las dosis utilizadas en investigaciones anteriores, las cuales dependen de los objetivos y protocolos experimentales de cada estudio.

La alteración de expresión de ER α y ER β podría indicar una desregulación de las vías de señalización estrogénica, alterando la homeostasis endometrial y afectando la función reproductiva (Hojnik et al., 2023).

Nuestros resultados coinciden con lo que se ha observado en estudios previos (Sahlin et al., 2006), que sugieren que la modulación de los receptores de estrógeno, tanto ER α como ER β , desempeña un papel crucial en las respuestas fisiológicas inducidas por el tratamiento con LEU en los modelos experimentales utilizados. Estos hallazgos refuerzan la idea de que ambos receptores de estrógeno contribuyen de manera significativa a la regulación de los efectos biológicos del estrógeno en el útero, aunque su expresión y modulación puedan variar en función del tratamiento y las condiciones experimentales.

En conjunto, estos resultados sugieren que la modulación de los receptores de estrógeno puede tener implicaciones importantes en la fisiopatología de trastornos hormonales, como la obesidad, y en la salud uterina, especialmente en el contexto de alteraciones hormonales inducidas por tratamientos como LEU.

Finalmente, en los animales delgados, que sirvieron como control en nuestra investigación, se observó una respuesta al tratamiento con leuprolide que alteró la señalización de GnRH. Es relevante destacar que, en estos animales tratados con LEU, se registró una disminución en el peso y el diámetro uterino, así como en el espesor endometrial. Este efecto puede explicarse por el hecho de que los animales se encontraban en la fase diestro de su ciclo estral, una etapa en la cual los niveles de estradiol son naturalmente bajos. El tratamiento con LEU pudo haber reducido aún más los niveles circulantes de E2, contribuyendo a la disminución observada en el diámetro uterino y el espesor endometrial de las ratas Long-Evans.

En cuanto a la expresión de los receptores estrogénicos, se observó un aumento en el marcaje de ER α en el tejido uterino de las ratas delgadas tras la administración de LEU, lo que podría indicar una regulación compensatoria en respuesta a la disminución de la señalización estrogénica. La inhibición de la función ovárica por LEU reduce los niveles de estrógenos, y como resultado, los tejidos uterinos podrían aumentar la expresión de ER α para mejorar su sensibilidad a los estrógenos circulantes, lo cual constituiría un mecanismo adaptativo. Sin embargo, se detectó una disminución en la expresión de ER β , lo que podría estar relacionado con la regulación diferencial de estos receptores en respuesta a la inhibición hormonal inducida por LEU. Cabe destacar que, de forma natural, la expresión de ER β en el tejido uterino es inferior a la de ER α , lo que podría explicar la disminución de ER β . Este patrón sugiere que los tejidos uterinos podrían priorizar la expresión de ER α para maximizar la respuesta estrogénica en un contexto de bajos niveles de estrógenos.

En conjunto, estos resultados indican que el tratamiento con LEU puede tener un efecto modulador sobre el útero y la regulación de los receptores estrogénicos, independientemente del estado de obesidad, lo que abre nuevas perspectivas sobre cómo la inhibición hormonal afecta la fisiología uterina.

Conclusión

Este estudio demuestra que el tratamiento con acetato de leuprolide en ratas Long Evans delgadas reduce tanto el peso como la morfología uterina. La administración de 1.5 μg incrementa la expresión del receptor $\text{ER}\alpha$, mientras que la 5 μg provoca una disminución en la expresión del receptor $\text{ER}\beta$.

En las ratas Zucker obesas, la obesidad resulta en una disminución en el peso uterino, en el área y grosor endometrial; sin embargo, la administración de LEU no modifica la morfología uterina. En este modelo, la dosis 2.5 μg reduce la expresión de los receptores de estrógenos, lo que sugiere que los efectos del agonista de GnRH dependen del estado metabólico del animal.

Estos resultados subrayan la relevancia de la obesidad como modulador de la respuesta hormonal y abren nuevas perspectivas para explorar su impacto en la salud reproductiva femenina.

Bibliografía citada:

1. Aleixandre, A., & Miguel, M. (2008). Ratas Zucker como modelo experimental para el estudio de diferentes enfermedades. *Endocrinología y Nutrición*, 55(5), 217–222.
2. Al-yasiry, R., Jwad, M., Hasan, M., & Alsayigh, H. (2022). How obesity affects female fertility. *Medical Journal of Babylon*, 19(2), 111. https://doi.org/10.4103/MJBL.MJBL_8_22
3. Andersson, H. (2008). Clinical Reproductive Endocrinology. En *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* (pp. 635–662). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370491-7.00021-0>
4. Babwah, A. V., Navarro, V. M., Ahow, M., Pampillo, M., Nash, C., Fayazi, M., Calder, M., Elbert, A., Urbanski, H. F., Wettschureck, N., Offermanns, S., Carroll, R. S., Bhattacharya, M., Tobet, S. A., & Kaiser, U. B. (2015). GnRH Neuron-Specific Ablation of $G\alpha_{q/11}$ Results in Only Partial Inactivation of the Neuroendocrine-Reproductive Axis in Both Male and Female Mice: *In Vivo* Evidence for Kiss1r-Coupled $G\alpha_{q/11}$ - Independent GnRH Secretion. *The Journal of Neuroscience*, 35(37), 12903–12916. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0041-15.2015>
5. Beck, B. (2000). Neuropeptides and obesity. *Nutrition*, 16(10), 916–923. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(00\)00410-X](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(00)00410-X)
6. Bivens, C. L. M., & Olster, D. H. (1997). Abnormal Estrous Cyclicity and Behavioral Hyporesponsiveness to Ovarian Hormones in Genetically Obese Zucker Female Rats¹. *Endocrinology*, 138(1), 143–148. <https://doi.org/10.1210/endo.138.1.4849>
7. Bodur Ozturk, H., Vural, B., Caliskan, E., & Solakoglu, S. (2010). Effect of GnRH analogues and octreotide treatment on apoptosis and the cell proliferation of

- endometrium adenocarcinoma cell lines. *Journal of the Turkish German Gynecological Association*, 11(3), 131–136. <https://doi.org/10.5152/jtgga.2010.19>
8. Bray, G. A., Saiduddin, S., York, D. A., & Swerdloff, R. S. (1976). Effect of Estradiol on Uterine Weight, Thyroid Function, Food Intake, and Pituitary Weight of Genetically Obese (Fatty-Zucker) and Lean Rats. *Experimental Biology and Medicine*, 153(1), 88–91. <https://doi.org/10.3181/00379727-153-39486>
 9. Carlos Carvajal Carvajal. (2019). Especies reactivas del oxígeno: Formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1).
 10. Crujeiras, A. B., & Casanueva, F. F. (2015). Obesity and the reproductive system disorders: Epigenetics as a potential bridge. *Human Reproduction Update*, 21(2), 249–261. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmu060>
 11. DeMAYO, F. J., Zhao, B., Takamoto, N., & Tsai, S. Y. (2002). Mechanisms of Action of Estrogen and Progesterone. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 955(1), 48–59. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb02765.x>
 12. Dias Da Silva, I., Wuidar, V., Zielonka, M., & Pequeux, C. (2024). Unraveling the Dynamics of Estrogen and Progesterone Signaling in the Endometrium: An Overview. *Cells*, 13(15), 1236. <https://doi.org/10.3390/cells13151236>
 13. Donnez, J., Tomaszewski, J., Vázquez, F., Bouchard, P., Lemieszczuk, B., Baró, F., Nouri, K., Selvaggi, L., Sadowski, K., Bestel, E., Terrill, P., Osterloh, I., & Loumaye, E. (2012). Ulipristal Acetate versus Leuprolide Acetate for Uterine Fibroids. *New England Journal of Medicine*, 366(5), 421–432. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1103180>
 14. Doulberis, M., Papaefthymiou, A., Polyzos, S. A., Katsinelos, P., Grigoriadis, N., Srivastava, D. S., & Kountouras, J. (2020). Rodent models of obesity. *Minerva Endocrinologica*, 45(3). <https://doi.org/10.23736/S0391-1977.19.03058-X>

15. Ercin, M. E., & Erdil, G. (2020). Effect of single-dose depot leuprolide acetate on embryonal implantation: An experimental rat model. *Gynecological Endocrinology*, 36(7), 611–614. <https://doi.org/10.1080/09513590.2019.1689555>
16. Escalona Mugica, J. R., Barajas Martínez, A., Alfaro Becerril, O. A., Estrada Rojo, F., Ángeles Castellanos, M., & Ubaldo-Reyes, L. M. (2021). Modelos animales en el estudio del síndrome metabólico. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 24. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2021.373>
17. Español, P., Luna, R., Soler, C., Caruana, P., Altés-Arranz, A., Rodríguez, F., Porta, O., Sanchez, O., Llurba, E., Rovira, R., & Céspedes, M. V. (2022). Neural plasticity of the uterus: New targets for endometrial cancer? *Women's Health*, 18, 17455057221095537. <https://doi.org/10.1177/17455057221095537>
18. Filindris, T., Papakonstantinou, E., Keramida, M., Panteris, E., Kalogeropoulos, S., Georgopoulos, N., Taniguchi, F., Adonakis, G., Harada, T., & Kaponis, A. (2024). The effect of GnRH-a on the angiogenesis of endometriosis. *Hormones*, 23(3), 509–515. <https://doi.org/10.1007/s42000-024-00559-6>
19. Foster, K. I., Flores Legarreta, A., Kamat, R., Handley, K. F., Glassman, D., How, J. A., Lawson, B. C., Westin, S. N., Ramondetta, L. M., Frumovitz, M., Gershenson, D. M., Sood, A. K., & Hillman, R. T. (2023). Clinical outcomes of leuprolide acetate in the treatment of recurrent ovarian granulosa cell tumors. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 228(6), 724.e1-724.e9. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2023.02.029>
20. Gambineri, A., Laudisio, D., Marocco, C., Radellini, S., Colao, A., & Savastano, S. (2019). Female infertility: Which role for obesity? *International Journal of Obesity Supplements*, 9(1), 65–72. <https://doi.org/10.1038/s41367-019-0009-1>

21. Gao, X., Li, Y., Ma, Z., Jing, J., Zhang, Z., Liu, Y., & Ding, Z. (2021). Obesity induces morphological and functional changes in female reproductive system through increases in NF- κ B and MAPK signaling in mice. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 19(1), 148. <https://doi.org/10.1186/s12958-021-00833-x>
22. Gonnella, F., Konstantinidou, F., Donato, M., Gatta, D. M. P., Peserico, A., Barboni, B., Stuppia, L., Nothnick, W. B., & Gatta, V. (2024). The Molecular Link between Obesity and the Endometrial Environment: A Starting Point for Female Infertility. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(13), 6855. <https://doi.org/10.3390/ijms25136855>
23. Guarraci, F. A., Avendano, L., Kelly, M., Estoesta, C., Sencherey, B., Valdivia, H. S., Gale, A., Yepez, L., Belfield, J. B., Carter, K. M., Williams, N., & Gore, A. C. (2023). Chronic periadolescent leuprolide exposure affects the development of reproductive physiology and behavior of female and male rats differently, but both mature after treatment termination. *Biology of Sex Differences*, 14(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s13293-022-00485-5>
24. Hall, J. E., & Guyton, A. C. (2011). *Guyton and Hall textbook of medical physiology* (12th ed). Saunders/Elsevier.
25. Hamilton, K. J., Hewitt, S. C., Arao, Y., & Korach, K. S. (2017). Estrogen Hormone Biology. En *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 125, pp. 109–146). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.12.005>
26. Hapangama, D. K., Kamal, A. M., & Bulmer, J. N. (2015). Estrogen receptor β : The guardian of the endometrium. *Human Reproduction Update*, 21(2), 174–193. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmu053>

27. Heine, P. A., Taylor, J. A., Iwamoto, G. A., Lubahn, D. B., & Cooke, P. S. (2000). Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor- α knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(23), 12729–12734. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.23.12729>
28. Hewitt, S. C., Winuthayanon, W., & Korach, K. S. (2016). What's new in estrogen receptor action in the female reproductive tract. *Journal of Molecular Endocrinology*, 56(2), R55–R71. <https://doi.org/10.1530/JME-15-0254>
29. Hill, A. M., Lessey, B., Flores, V. A., & Taylor, H. S. (2018). Bazedoxifene/conjugated estrogens in combination with leuprolide for the treatment of endometriosis. *Clinical Case Reports*, 6(6), 990–994. <https://doi.org/10.1002/ccr3.1501>
30. Hoffman, B. L., Schorge, J. O., Schaffer, J. I., Halvorson, L. M., Bradshaw, K. D., Cunningham, F. G., & Calver, L. E. (2011). Capítulo 16: Endocrinología de la reproducción. En *Williams Ginecología* (4e ed.). McGraw-Hill Education.
31. Hoffman, B. L., Schorge, J. O., Schaffer, J. I., Halvorson, L. M., Bradshaw, K. D., Cunningham, F. G., & Calver, L. E. (Eds.). (2012). *Williams gynecology* (Second Edition). McGraw-Hill Medical.
32. Hojnik, M., Sinreih, M., Anko, M., Hevir-Kene, N., Knific, T., Pirš, B., Grazio, S. F., & Rižner, T. L. (2023). The Co-Expression of Estrogen Receptors ER α , ER β , and GPER in Endometrial Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 3009. <https://doi.org/10.3390/ijms24033009>
33. Jaime Albornoz, V., & Gonzalo Duque, A. (2010). Patología uterina y su impacto en la fertilidad. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 21(3), 409–415. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(10\)70552-6](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(10)70552-6)

34. Jesús A. F. Tresguerres, Carmen Ariznavarreta Ruiz, Victoria Cachofeiro, Daniel P. Cardinali, Eduardo Escrich Escriche, Pablo E. Gil-Loyzaga, Vicente Lahera Juliá, Francisco Mora Teruel, Marta Romano Pardo, & J. Tamargo Menéndez. (2005). Capítulo 83: Fisiología del eje hipotálamo-hipófiso-ovárico. En *Fisiología humana* (4e ed.). McGraw Hill.
35. Jones, R. E., & Lopez, K. H. (2014). The Female Reproductive System. En *Human Reproductive Biology* (pp. 23–50). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382184-3.00002-7>
36. Kateryna Sikora, Mykola Lyndin, Nataliia Hyriavenko, Yulia Lyndina, Vladyslav Sikora, & Anatolii Romaniuk. (2021). *Morphological features of the rat uterus*. *49(294)*, 420–425.
37. Keen-Rhinehart, E., Kalra, S. P., & Kalra, P. S. (2004). Leptin-Receptor Gene Transfer into the Arcuate Nucleus of Female Fatty Zucker Rats Using Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors Stimulates the Hypothalamo-Pituitary-Gonadal Axis1. *Biology of Reproduction*, *71(1)*, 266–272. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.025858>
38. Kim, E. H., Kim, J. Y., Lee, Y. H., Chong, G. O., Park, J. Y., & Hong, D. G. (2014). Comparison of estrogen receptor- α , progesterone receptor and calponin expression in gonadotrophin-releasing hormone agonist-sensitive and -resistant uterine fibroids. *Obstetrics & Gynecology Science*, *57(2)*, 144. <https://doi.org/10.5468/ogs.2014.57.2.144>
39. Kitajima, Y., Endo, T., Nagasawa, K., Manase, K., Honnma, H., Baba, T., Hayashi, T., Chiba, H., Sawada, N., & Saito, T. (2006). Hyperstimulation and a Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist Modulate Ovarian Vascular Permeability by Altering

Expression of the Tight Junction Protein Claudin-5. *Endocrinology*, 147(2), 694–699.

<https://doi.org/10.1210/en.2005-0700>

40. Kiyama, R., & Wada-Kiyama, Y. (2015). Estrogenic endocrine disruptors: Molecular mechanisms of action. *Environment International*, 83, 11–40.

<https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.05.012>

41. Kleinert, M., Clemmensen, C., Hofmann, S. M., Moore, M. C., Renner, S., Woods, S. C., Huypens, P., Beckers, J., De Angelis, M. H., Schürmann, A., Bakhti, M., Klingenspor, M., Heiman, M., Cherrington, A. D., Ristow, M., Lickert, H., Wolf, E., Havel, P. J., Müller, T. D., & Tschöp, M. H. (2018). Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, 14(3), 140–162.

<https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.161>

42. Krishnan, V., Heath, H., & Bryant, H. U. (2000). Mechanism of action of estrogens and selective estrogen receptor modulators. En *Vitamins & Hormones* (Vol. 60, pp. 123–147). Elsevier.

[https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(00\)60018-3](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(00)60018-3)

43. Kurman, R. J., & Shih, I.-M. (2010). The Origin and Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer: A Proposed Unifying Theory. *American Journal of Surgical Pathology*, 34(3), 433–443.

<https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3181cf3d79>

44. Kuryłowicz, A. (2023). Estrogens in Adipose Tissue Physiology and Obesity-Related Dysfunction. *Biomedicines*, 11(3), 690. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11030690>

45. León, S., Fernandois, D., Sull, A., Sull, J., Calder, M., Hayashi, K., Bhattacharya, M., Power, S., Vilos, G. A., Vilos, A. G., Tena-Sempere, M., & Babwah, A. V. (2016). Beyond the brain-Peripheral kisspeptin signaling is essential for promoting endometrial

gland development and function. *Scientific Reports*, 6(1), 29073.

<https://doi.org/10.1038/srep29073>

46. Lessey, B. A., Killam, A. P., Metzger, D. A., Haney, A. F., Greene, G. L., & McCARTY, K. S. (1988). Immunohistochemical Analysis of Human Uterine Estrogen and Progesterone Receptors Throughout the Menstrual Cycle*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *67*(2), 334–340. <https://doi.org/10.1210/jcem-67-2-334>
47. Lin, P. C., Bhatnagar, K. P., Nettleton, G. S., & Nakajima, S. T. (2002). Female genital anomalies affecting reproduction. *Fertility and Sterility*, *78*(5), 899–915. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)03368-X](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)03368-X)
48. Marquardt, R. M., Kim, T. H., Shin, J.-H., & Jeong, J.-W. (2019). Progesterone and Estrogen Signaling in the Endometrium: What Goes Wrong in Endometriosis? *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(15), 3822. <https://doi.org/10.3390/ijms20153822>
49. Matia-García, I., de la Cruz-Mosso, U., Muñoz-Valle, J. F., & Parra-Rojas, I. (2014). Macrophage migration inhibitory factor and its relationship with obesity and diabetes. *Investigacion Clinica*, *55*(3), 266–277.
50. Matsuzaki, S. (1999). Oestrogen receptor alpha and mRNA expression in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Molecular Human Reproduction*, *5*(6), 559–564. <https://doi.org/10.1093/molehr/5.6.559>
51. Matsuzaki, S., Uehara, S., Murakami, T., Fujiwara, J., Funato, T., & Okamura, K. (2000). Quantitative analysis of estrogen receptor alpha and beta messenger ribonucleic acid levels in normal endometrium and ovarian endometriotic cysts using a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *Fertility and Sterility*, *74*(4), 753–759. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(00\)00712-3](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(00)00712-3)

52. Mauvais-Jarvis, F. (2011). Estrogen and androgen receptors: Regulators of fuel homeostasis and emerging targets for diabetes and obesity. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 22(1), 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.10.002>
53. Mirabolghasemi, G., & Kamyab, Z. (2017). Changes of The Uterine Tissue in Rats with Polycystic Ovary Syndrome Induced by Estradiol Valerate. *International Journal of Fertility and Sterility*, 11(1). <https://doi.org/10.22074/ijfs.2016.4794>
54. Nephew, K. P., Long, X., Osborne, E., Burke, K. A., Ahluwalia, A., & Bigsby, R. M. (2000). Effect of Estradiol on Estrogen Receptor Expression in Rat Uterine Cell Types1. *Biology of Reproduction*, 62(1), 168–177. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.1.168>
55. Otani, K., Funada, H., Teranishi, R., Okada, M., & Yamawaki, H. (2022). Cardiovascular Characteristics of Zucker Fatty Diabetes Mellitus Rats, an Animal Model for Obesity and Type 2 Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(8), 4228. <https://doi.org/10.3390/ijms23084228>
56. Padmanabhan, V., Puttabyatappa, M., & Cardoso, R. C. (2018). Hypothalamus–Pituitary–Ovary Axis. En *Encyclopedia of Reproduction* (pp. 121–129). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64632-9>
57. Pandey, S., & Dvorakova, M. C. (2020). Future Perspective of Diabetic Animal Models. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, 20(1), 25–38. <https://doi.org/10.2174/1871530319666190626143832>
58. Pasquali, R., Patton, L., & Gambineri, A. (2007). Obesity and infertility. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity*, 14(6), 482–487. <https://doi.org/10.1097/MED.0b013e3282f1d6cb>

59. Patel, R., & Shah, G. (2018). Evaluation of ovarian and metabolic effects of GnRH modulators in two rat models of polycystic ovary syndrome. *Molecular Reproduction and Development*, *85*(10), 778–789. <https://doi.org/10.1002/mrd.23059>
60. Paterni, I., Granchi, C., Katzenellenbogen, J. A., & Minutolo, F. (2014). Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): Subtype-selective ligands and clinical potential. *Steroids*, *90*, 13–29. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.06.012>
61. Pedroza-García, K. A., Calderón-Vallejo, D., Cervantes-García, D., Quintanar-Stephano, A., Salinas, E., & Quintanar, J. L. (2023). Effect of Leuprolide Acetate, a GnRH Agonist, on Neuroinflammation and Anxiety-Like Behavior after Mild Hypoxic-Ischemic Encephalopathy in Rat Model. *Neuroimmunomodulation*, *30*(1), 206–212. <https://doi.org/10.1159/000533388>
62. Penzias, A., Azziz, R., Bendikson, K., Falcone, T., Hansen, K., Hill, M., Jindal, S., Kalra, S., Mersereau, J., Reindollar, R., Shannon, C. N., Steiner, A., Tanrikut, C., Taylor, H., & Yauger, B. (2021). Obesity and reproduction: A committee opinion. *Fertility and Sterility*, *116*(5), 1266–1285. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2021.08.018>
63. Pirtea, P., De Ziegler, D., & Ayoubi, J.-M. (2022). Uterine infertility, the last frontier. *Fertility and Sterility*, *118*(3), 463–464. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2022.06.032>
64. Plaza-Parrochia, F., Romero, C., Valladares, L., & Vega, M. (2017). Endometrium and steroids, a pathologic overview. *Steroids*, *126*, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2017.08.007>
65. Plosker, G. L., & Brogden, R. N. (1994). Leuprorelin: A Review of its Pharmacology and Therapeutic Use in Prostatic Cancer, Endometriosis and Other Sex Hormone-

- Related Disorders. *Drugs*, 48(6), 930–967. <https://doi.org/10.2165/00003495-199448060-00008>
66. Puga y Colmenares, M. C., Trujillo Hernández, A., & Morales-Ledesma, L. (2021). Unilateral section of the superior ovarian nerve induces first ovulation in the Zucker fatty (fa/fa) rat. *General and Comparative Endocrinology*, 300, 113636. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113636>
67. Ramírez-González, J. A., Vaamonde-Lemos, R., Cunha-Filho, J. S., Varghese, A. C., & Swanson, R. J. (2016). Overview of the Female Reproductive System. En D. Vaamonde, S. S. Du Plessis, & A. Agarwal (Eds.), *Exercise and Human Reproduction* (pp. 19–46). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3402-7_2
68. Restrepo C. y Gustavo Adolfo. (2010). *ENDOMETRIOSIS, ENDOMETRIOMA AND INFERTILITY*. 18(2), 197–209.
69. Revel, A. (2012). Defective endometrial receptivity. *Fertility and Sterility*, 97(5), 1028–1032. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.03.039>
70. Richard, A. J., White, U., Elks, C. M., & Stephens, J. M. (2000). Adipose Tissue: Physiology to Metabolic Dysfunction. En K. R. Feingold, B. Anawalt, M. R. Blackman, A. Boyce, G. Chrousos, E. Corpas, W. W. de Herder, K. Dhatariya, K. Dungan, J. Hofland, S. Kalra, G. Kaltsas, N. Kapoor, C. Koch, P. Kopp, M. Korbonits, C. S. Kovacs, W. Kuohung, B. Laferrère, ... D. P. Wilson (Eds.), *Endotext*. MDText.com, Inc. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555602/>
71. Sagae, S. C., Menezes, E. F., Bonfleur, M. L., Vanzela, E. C., Zacharias, P., Lubaczeuski, C., Franci, C. R., & Sanvitto, G. L. (2012). Early onset of obesity induces reproductive deficits in female rats. *Physiology & Behavior*, 105(5), 1104–1111. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.12.002>

72. Sahin Ersoy, G., Zolbin, M. M., Cosar, E., Mamillapalli, R., & Taylor, H. S. (2017). Medical Therapies for Endometriosis Differentially Inhibit Stem Cell Recruitment. *Reproductive Sciences*, *24*(6), 818–823. <https://doi.org/10.1177/1933719116682879>
73. Sahlin, L., Masironi, B., Åkerberg, S., & Eriksson, H. (2006). Tissue- and hormone-dependent progesterone receptor distribution in the rat uterus. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *4*(1), 47. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-4-47>
74. Sar, M., & Welsch, F. (1999). Differential Expression of Estrogen Receptor- β and Estrogen Receptor- α in the Rat Ovary. *Endocrinology*, *140*(2), 963–971. <https://doi.org/10.1210/endo.140.2.6533>
75. Sasaki, M., Kaneuchi, M., Fujimoto, S., Tanaka, Y., & Dahiya, R. (2003). Hypermethylation can selectively silence multiple promoters of steroid receptors in cancers. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *202*(1–2), 201–207. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(03\)00084-4](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(03)00084-4)
76. Sasayama, D., Sugiyama, N., Yonekubo, S., Pawlak, A., Murasawa, H., Nakamura, M., Hayashi, M., Ogawa, T., Moro, M., Washizuka, S., Amano, N., Hongo, K., & Ohnota, H. (2017). Novel oestrogen receptor β -selective ligand reduces obesity and depressive-like behaviour in ovariectomized mice. *Scientific Reports*, *7*(1), 4663. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04946-5>
77. Sharma, G., Hu, C., Staquicini, D. I., Brigman, J. L., Liu, M., Mauvais-Jarvis, F., Pasqualini, R., Arap, W., Arterburn, J. B., Hathaway, H. J., & Prossnitz, E. R. (2020). Preclinical efficacy of the GPER-selective agonist G-1 in mouse models of obesity and diabetes. *Science Translational Medicine*, *12*(528), eaau5956. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau5956>

78. Shaw, E., Farris, M., McNeil, J., & Friedenreich, C. (2016). Obesity and Endometrial Cancer. En T. Pischon & K. Nimptsch (Eds.), *Obesity and Cancer* (Vol. 208, pp. 107–136). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-42542-9_7
79. Šišljagić, D., Blažetić, S., Heffer, M., Vranješ Delač, M., & Muller, A. (2024). The Interplay of Uterine Health and Obesity: A Comprehensive Review. *Biomedicines*, *12*(12), 2801. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12122801>
80. Song, Z., Xiaoli, A. M., & Yang, F. (2018). Regulation and Metabolic Significance of De Novo Lipogenesis in Adipose Tissues. *Nutrients*, *10*(10), 1383. <https://doi.org/10.3390/nu10101383>
81. Stygar, D., Muravitskaya, N., Eriksson, B., Eriksson, H., & Sahlin, L. (2003). Effects of SERM (selective estrogen receptor modulator) treatment on growth and proliferation in the rat uterus. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *1*(1), 40. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-40>
82. Suszka-Świtek, A., Czekaj, P., Pająk, J., Skowronek, R., Wrona-Bogus, K., Plewka, D., Kozłowska-Rup, D., Wiaderkiewicz, R., & Jankowski, A. (2012). Zmiany morfologiczne i enzymatyczne wywołane długoterminowym podawaniem samicom szczura niskiej dawki agonisty i antagonisty gonadoliberyny. *Medical Science Monitor*, *18*(8), BR315–BR330. <https://doi.org/10.12659/MSM.883264>
83. Tammy Fernández-Romero, Gipsis Suárez-Román, & Sonia Clapés. (2021). Protocolo para la citología vaginal directa de ratas de laboratorio. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, *20*(3). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2021000300005&lng=es&tlng=es.

84. Taylor, E., & Gomel, V. (2008). The uterus and fertility. *Fertility and Sterility*, 89(1), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.09.069>
85. Teutonico, D., Montanari, S., & Ponchel, G. (2012). Leuprolide acetate: Pharmaceutical use and delivery potentials. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 9(3), 343–354. <https://doi.org/10.1517/17425247.2012.662484>
86. Usadi, R. S., Groll, J. M., Lessey, B. A., Lininger, R. A., Zaino, R. J., Fritz, M. A., & Young, S. L. (2008). Endometrial Development and Function in Experimentally Induced Luteal Phase Deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93(10), 4058–4064. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-0460>
87. Wang, B., Chandrasekera, P., & Pippin, J. (2014). Leptin- and Leptin Receptor-Deficient Rodent Models: Relevance for Human Type 2 Diabetes. *Current Diabetes Reviews*, 10(2), 131–145. <https://doi.org/10.2174/1573399810666140508121012>
88. Weigt, C., Hertrampf, T., Flenker, U., Hülsemann, F., Kurnaz, P., Fritzemeier, K. H., & Diel, P. (2015). Effects of estradiol, estrogen receptor subtype-selective agonists and genistein on glucose metabolism in leptin resistant female Zucker diabetic fatty (ZDF) rats. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 154, 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.06.002>
89. Weihua, Z., Saji, S., Mäkinen, S., Cheng, G., Jensen, E. V., Warner, M., & Gustafsson, J.-Å. (2000). Estrogen receptor (ER) β , a modulator of ER α in the uterus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(11), 5936–5941. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.11.5936>
90. Weng, H., Liu, F., Hu, S., Li, L., & Wang, Y. (2014). GnRH agonists induce endometrial epithelial cell apoptosis via GRP78 down-regulation. *Journal of Translational Medicine*, 12(1), 306. <https://doi.org/10.1186/s12967-014-0306-y>

91. Wilson, A. C., Vadakkadath Meethal, S., Bowen, R. L., & Atwood, C. S. (2007a). Leuprolide acetate: A drug of diverse clinical applications. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 16(11), 1851–1863. <https://doi.org/10.1517/13543784.16.11.1851>
92. Wilson, A. C., Vadakkadath Meethal, S., Bowen, R. L., & Atwood, C. S. (2007b). Leuprolide acetate: A drug of diverse clinical applications. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 16(11), 1851–1863. <https://doi.org/10.1517/13543784.16.11.1851>
93. Wilson, M. R., Skalski, H., Reske, J. J., Wegener, M., Adams, M., Hostetter, G., Hoffmann, H. M., Bernard, J. J., Bae-Jump, V. L., Teixeira, J. M., & Chandler, R. L. (2022). Obesity alters the mouse endometrial transcriptome in a cell context-dependent manner. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 20(1), 163. <https://doi.org/10.1186/s12958-022-01030-0>
94. Xiaoqin Ye. (2020). Uterine Luminal Epithelium as the Transient Gateway for Embryo Implantation. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 31(2), 165–180. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2019.11.008>
95. You, M.-K., Rhuy, J., Jeong, K. S., Bang, M.-A., Kim, M.-S., & Kim, H.-A. (2014). Effect of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) on obesity, lipid metabolism and uterine epithelial proliferation in ovariectomized rats. *Nutrition Research and Practice*, 8(3), 292. <https://doi.org/10.4162/nrp.2014.8.3.292>
96. Yu, K., Huang, Z.-Y., Xu, X.-L., Li, J., Fu, X.-W., & Deng, S.-L. (2022). Estrogen Receptor Function: Impact on the Human Endometrium. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 827724. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.827724>

97. Yu, Y., Fuscoe, J. C., Zhao, C., Guo, C., Jia, M., Qing, T., Bannon, D. I., Lancashire, L., Bao, W., Du, T., Luo, H., Su, Z., Jones, W. D., Moland, C. L., Branham, W. S., Qian, F., Ning, B., Li, Y., Hong, H., ... Wang, C. (2014). A rat RNA-Seq transcriptomic BodyMap across 11 organs and 4 developmental stages. *Nature Communications*, 5(1), 3230. <https://doi.org/10.1038/ncomms4230>
98. Zhang, J., Dong, L., Zhang, S., & Wang, L. (2022). Analysis of the clinical efficacy of leuprolide acetate in the treatment of obese patients with endometriosis and its role on the expression of MIF gene. *Cellular and Molecular Biology*, 67(4), 282–288. <https://doi.org/10.14715/cmb/2021.67.4.31>
99. Zhang, Q., Shen, Q., Celestino, J., Milam, M. R., Westin, S. N., Lacour, R. A., Meyer, L. A., Shipley, G. L., Davies, P. J. A., Deng, L., McCampbell, A. S., Broaddus, R. R., & Lu, K. H. (2009). Enhanced estrogen-induced proliferation in obese rat endometrium. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 200(2), 186.e1-186.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2008.08.064>