



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**“Efecto del agonista de GnRH, acetato de
leuprolide, sobre la función ovárica y el grosor
endometrial en la rata hembra Zucker obesa adulta”**

Tesis para obtener el grado de
Maestra en ciencias biológicas

P R E S E N T A

Biól. Natalia Martínez García

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Lorena Milflores Flores

CODIRECTORA DE TESIS

Dra. Angélica Trujillo Hernández



Puebla, Pue.

Mayo, 2025

*“No debes temer a los problemas ni a los fracasos.
Cada error te enseña algo valioso.
Lo único que realmente debes temer es no intentarlo”*

— Gertrude B. Elion, *The Purine Path to Chemotherapy* (1988).

Votos Aprobatorios del Comité que integrará el Jurado de Examen de Grado.

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD Y DE NO PLAGIO

Yo, **Natalia Martínez García**; alumna del posgrado de la Maestría en Ciencias Biológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla con matrícula **223470517** y autora de la tesis titulada: **“Efecto del agonista de GnRH, acetato de leuprolide, sobre la función ovárica y el grosor endometrial en la rata hembra Zucker obesa adulta”**

DECLARO QUE:

El presente trabajo de investigación y tema de tesis presentada para la obtención de grado de **Maestra en Ciencias Biológicas** es original, siendo resultado de mi trabajo personal, mismo que no se ha copiado, ni se han utilizado ideas, formulaciones, citas completas “stricto sensu” e ilustraciones diversas sacadas de cualquier tesis, obra, artículo, memoria, etc., (en versión digital o impresa), sin mencionar de forma clara y exacta su origen o autor; tanto en el cuerpo del texto, figuras, cuadros, tablas u otros que tengan derechos de autor.

Declaro que el trabajo de investigación que pongo en consideración para la evaluación no ha sido presentado anteriormente para obtener algún grado académico o título, ni ha sido publicado en algún sitio. En este sentido, soy consciente de que el hecho de no respetar los derechos de autor y hacer plagio son objeto de sanciones universitarias y/o legales, por lo que asumo cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de las irregularidades en la tesis, así como de los derechos sobre la obra presentada. Asimismo, me hago responsable ante la universidad o terceros, de cualquier irregularidad o daño que pudiera ocasionar por el incumplimiento de lo declarado.

H. Puebla de Zaragoza a 04 de Agosto de 2025



Natalia Martínez García

Agradecimientos Institucionales

Agradezco a la **Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI)** por el apoyo con la beca otorgada No. **1318398** para la realización de mis estudios de maestría.

A la **Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado** de la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla** por el financiamiento para la realización de este trabajo vía el proyecto grupal 100274222-VIEP 2024 y 2025 a favor del cuerpo académico BUAP-CA-288–Neuroendocrinología y cuya responsable fue la Dra. Angélica Trujillo Hernández.

Al programa de **Maestría en Ciencias Biológicas** de la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla** incluida en el PNPC (Clave 005671) por haberme brindado la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado, así como a la coordinación del posgrado, por su acompañamiento a lo largo de este proceso académico.

Al **Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular del Instituto de Ciencias** de la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla** por el apoyo brindado en la realización del trabajo de investigación.

Y al **Bioterio Claude Bernard** de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por los espacios, el respaldo y las facilidades otorgadas para el desarrollo del presente proyecto.

Agradecimientos Personales

Este trabajo no hubiera sido posible sin el amor, la paciencia y el apoyo de las personas que me acompañaron a lo largo de este camino.

A la **Dra. Lorena Milflores Flores**, gracias por su apoyo, orientación y confianza a lo largo de este proceso.

A la **Dra. Angélica**, le debo un profundo agradecimiento por abrirme las puertas de su laboratorio y confiar en mí desde el inicio. Su guía constante, su paciencia para enseñarme, su disposición para compartir conocimientos y su capacidad de orientarme con firmeza y empatía hicieron posible que este proyecto avanzara y se consolidara. Más allá de lo académico, me transmitió el valor de la disciplina y la pasión por la investigación y por ello le estaré siempre agradecida.

A mi comité tutorial, conformado por la **Dra. Berenice Venegas Meneses** y el **Dr. Juan Manuel Bravo Benítez**, gracias por su tiempo, sus observaciones y recomendaciones que enriquecieron este trabajo. Su acompañamiento fue esencial para que esta investigación alcanzara un nivel más sólido y completo.

A mi familia, que ha sido mi base, mi refugio y mi mayor motivación. A mi mamá, **Marisol**, por su cariño incondicional, por sus palabras de aliento en los momentos de mayor duda y por enseñarme con su ejemplo que la constancia y el amor son la verdadera fuerza para seguir adelante. A mi papá, **Amado**, por confiar siempre en mí, por recordarme que todo esfuerzo tiene su recompensa y por apoyarme en cada paso que me acercaba a este objetivo. A mi hermano **Ismael**, gracias infinitas por escucharme pacientemente en tantas ocasiones, por darme tu tiempo mientras ensayaba mis presentaciones, por ayudarme siempre que lo necesité y por recordarme con tu cercanía que nunca estuve sola en este proceso.

A **Ohtokani**, mi compañero de vida, gracias por tu apoyo incondicional, por ser parte de cada ensayo, de cada momento de alegría y también de los episodios de cansancio, frustración y colapso. Gracias por sostenerme cuando sentía que no podía continuar, por escucharme sin juzgar y por recordarme siempre la razón por la que valía la pena luchar por mis sueños. Este logro también es tuyo, porque tu presencia fue esencial en todo este recorrido. Te amo.

A mis compañeros de laboratorio, **Cony** y **Alain**, gracias por compartir sus conocimientos y consejos que enriquecieron mi trabajo experimental. Gracias también por regalarme momentos de risa, de conversación ligera y de amistad, que me ayudaron a sobrellevar las largas horas de trabajo y me recordaron la importancia de disfrutar el camino. A **Liz**, mi gratitud más especial por acompañarme en uno de los momentos más complejos de este proyecto: el sacrificio de los animales. Su apoyo técnico, pero sobre todo emocional, hizo de ese proceso un reto mucho más llevadero. Su compañía en ese instante fue fundamental para que pudiera enfrentarlo con fortaleza.

A mis compañeros de maestría, especialmente a **Ely**, **Aarón** y **Lizardo**, gracias por compartir su talento, por las charlas, los consejos y la compañía en cada etapa de este posgrado. Cada uno, desde su área de formación, me inspiró a crecer y a dar lo mejor de mí. Haber compartido con ustedes este recorrido académico y humano fue un privilegio que atesoraré siempre.

A mis fieles compañeros de casa, **Hela**, **Lucifer** y **Padmé**, que estuvieron a mi lado en tantas noches de desvelo, acompañándome en silencio mientras trabajaba, y que con su simple presencia me transmitieron calma y consuelo cuando más lo necesitaba. Y a **Hades**, que aunque ya no está, sigue siendo inspiración y motivo para haber iniciado este camino y para dar cada día lo mejor de mí.

A mis amigos del **Consejo Científico**, que aunque el tiempo y la distancia hayan reducido nuestros encuentros, siguen ocupando un lugar especial en mi corazón. Su amistad, enseñanzas y recuerdos me acompañaron de manera silenciosa, pero constante, a lo largo de este proceso.

A todas las personas que, aunque no estén nombradas aquí una por una, forman parte de mi historia en este posgrado: **familiares, amigos, colegas y compañeros** que me brindaron compañía, palabras de aliento y gestos de apoyo. Cada uno aportó algo valioso para que yo pudiera llegar hasta aquí.

Finalmente, expreso mi más profunda gratitud a las **ratas** que dieron su vida para la realización de este estudio. Su existencia y su sacrificio fueron la base del conocimiento generado en este proyecto. Mi compromiso siempre fue que su contribución tuviera sentido y trascendencia, y espero haber honrado esa entrega con el valor de este trabajo. Mi eterna gratitud hacia ellas.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	- 1 -
INTRODUCCIÓN	- 2 -
MARCO TEÓRICO	- 3 -
Eje hipotálamo-hipófisis-ovario	- 3 -
Ovario.....	- 5 -
Desarrollo folicular	- 6 -
Selección final del folículo	- 11 -
Ovulación	- 11 -
Atresia folicular	- 12 -
Cuerpo lúteo	- 12 -
Esteroidogénesis	- 13 -
Ciclo estral en la rata	- 15 -
Útero	- 17 -
Obesidad y alteraciones en el eje reproductivo.....	- 19 -
Modelos animales utilizados en el estudio de obesidad.....	- 22 -
GnRH y función de sus agonistas	- 24 -
ANTECEDENTES	- 27 -
Alteraciones reproductivas en la rata Zucker obesa	- 27 -
Uso de leuprolide para estimulación de la ovulación	- 28 -
Farmacocinética.....	- 28 -
Farmacodinamia	- 28 -
JUSTIFICACIÓN	- 31 -
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	- 32 -
HIPÓTESIS	- 32 -
OBJETIVO GENERAL	- 32 -
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	- 32 -
METODOLOGÍA	- 33 -

Diseño experimental	- 33 -
Administración de LEU	- 36 -
Parámetros zoométricos y ciclo estral	- 36 -
Procedimiento de autopsia	- 38 -
Perfil metabólico Principio del formulario.....	- 39 -
Análisis de ovulación	- 40 -
Análisis de la población folicular.....	- 41 -
Análisis del útero.....	- 42 -
Administración de LEU durante 21 días	- 43 -
Análisis estadístico	- 43 -
RESULTADOS.....	- 44 -
DETERMINACIÓN DE LA DOSIS EFECTIVA DE LEU:.....	- 44 -
Parámetros zoométricos	- 44 -
Perfil metabólico	- 48 -
Peso relativo de los órganos	- 50 -
Parámetros reproductivos.....	- 52 -
Elección de la dosis efectiva.....	- 60 -
ADMINISTRACIÓN DE LEU POR 21 DÍAS	- 61 -
Parámetros zoométricos.....	- 61 -
Consumo de alimento.....	- 62 -
Perfil metabólico	- 65 -
Peso relativo de los órganos	- 66 -
Parámetros reproductivos.....	- 68 -
Análisis histológico de tejidos reproductivos	- 74 -
RESUMEN DE RESULTADOS PRINCIPALES	- 80 -
DISCUSIÓN	- 82 -
CONCLUSIÓN.....	- 88 -
PERSPECTIVAS DEL TRABAJO.....	- 88 -
LITERATURA CITADA.....	- 89 -

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquematación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada en rata hembra con normopeso. Elaborado en BioRender por Natalia Martínez García de múltiples fuentes (Clément *et al.*, 2020; Plant, 2015; Rance *et al.*, 2010; Clarkson *et al.*, 2017; Pacheco, 2010). - 5 -
- Figura 2.** Esquema de la anatomía ovárica en donde se muestran las tres regiones principales que lo conforman (hilio, corteza externa y médula central), así como los diferentes estadios de los folículos ováricos. Elaborado en BioRender por Natalia Martínez García de múltiples fuentes (Lew, 2019; Puttabyatappa y Padmanabhan, 2018). - 6 -
- Figura 3.** Esquematación del proceso de reclutamiento y selección folicular en ovarios humanos y de rata. En humanos, el desarrollo desde el folículo primordial hasta la ovulación ocurre en periodos prolongados: >120 días hasta el estadio secundario, ~71 días hasta el folículo antral y 14 días para el proceso de selección y dominancia que culmina con la ovulación. En ratas, los tiempos son más cortos: >30 días desde el estadio primordial al secundario, 28 días hasta el folículo antral y 2–3 días para alcanzar la ovulación. Elaborado en BioRender por Natalia Martínez García y modificado de McGee y Hsueh (2000). - 8 -
- Figura 4.** Representación esquemática del desarrollo del folículo ovárico y la ovulación. Elaborado en BioRender por Natalia Martínez García de múltiples fuentes (Lee *et al.*, 2019; McGee y Hsueh, 2000). - 10 -
- Figura 5.** Síntesis de esteroides sexuales en hembras. Elaborado en BioRender por Natalia Martínez García de múltiples fuentes (Louw-du Toit *et al.*, 2017; Jamnongjit y Hammes, 2006; Wood y Strauss, 2002; Christenson y Strauss, 2000; Stocco, 2001; Miller y Auchus, 2011). - 14 -
- Figura 6.** Imágenes representativas de las fases del ciclo estral (tinción con hematoxilina/eosina). El proestro se caracteriza por masas de células epiteliales nucleadas redondas. El estro se puede identificar por agregados de células cornificadas escamosas. El metaestro y el diestro expresan una combinación de tipos de células (leucocitos, células nucleadas y cornificadas), pero muestran menos células. N: Células nucleadas, C: Células cornificadas y L: Leucocitos Elaborado por Natalia Martínez García. - 16 -
- Figura 7.** Anatomía del útero de rata. Tomado de De la Rosa, 2018. - 17 -
- Figura 8.** Corte histológico del útero de rata Wistar, en donde se observan las tres capas de tejido que lo conforman (tinción con hematoxilina/eosina). Tomado de De la Rosa, 2018. - 18 -
- Figura 9.** Esquematación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada en organismos con obesidad. Elaborado por Natalia Martínez García de múltiples fuentes (Brannian *et al.*, 2001; Rachoñ y Teede, 2010; Jungheim y Moley, 2010; Broughton y Moley, 2017; De la Riva, 2018; Pacheco, 2010; Munguía, Montaña y Hernández, 2023). - 22 -
- Figura 10.** Red de señalización GnRHR simplificada. GnRH-I activa GnRHR provocando una activación de la fosfolipasa C (PLC) mediada por Gq/11. Esto genera IP3 que impulsa la movilización mediada por el receptor IP3 desde los almacenes intracelulares, y diacilglicerol (DAG) que (con Ca²⁺) activa las isoenzimas PKC convencionales. La GnRH-I aumenta el Ca²⁺ citoplasmático y esto impulsa la secreción exocitótica regulada de LH y FSH desde el interior de las vesículas secretoras. El Ca²⁺ también activa la calmodulina (CaM), que activa las proteínas quinasas dependientes de CaM (CaMK) y la fosfatasa calcineurina (Cn), que activa el Ca²⁺-factor de transcripción dependiente NFAT (factor nuclear de células T activadas). La GnRH-I también activa las cascadas MAPK, incluida la activación (en gran medida mediada por PKC) de la cascada Raf/MEK/ERK que se muestra. Los factores de transcripción activados por NFAT y ERK (entre otros) actúan en combinación para controlar la expresión genética. Los genes diana de GnRH incluyen las subunidades de gonadotropina; La GnRH-I regula de forma aguda la tasa de fusión

de las vesículas con la membrana plasmática y regula de forma crónica el contenido de gonadotropinas de estas vesículas (Tomado de Pratap *et al.*, 2017). - 25 -

Figura 11. Diagrama de diseño experimental que muestra los diferentes grupos experimentales para la determinación de la dosis efectiva de LEU, así como los parámetros a evaluar durante el experimento en general. - 34 -

Figura 12. Diagrama de diseño experimental que muestra los diferentes grupos experimentales en la administración de LEU durante 21 días, así como los parámetros a evaluar durante el experimento en general. - 35 -

Figura 13. Toma de parámetro zoométricos. A) Longitud total, B) Longitud de la cola y C) Circunferencia del abdomen. - 37 -

Figura 14. Imágenes representativas de cada fase del ciclo estral. A) Proestro, B) Estro, C) Metaestro y D) Diestro. - 38 -

Figura 15. Imagen representativa de la determinación de cuerpos lúteos, CL: Cuerpo lúteo (4x, campo claro). - 40 -

Figura 16. Medición del diámetro de folículos con ovocito, núcleo y nucléolo visibles en cortes histológicos ováricos. Se muestran los dos diámetros utilizados para calcular el tamaño promedio de cada folículo. La línea verde representa el primer diámetro (diámetro mayor) y la línea azul representa el diámetro perpendicular (diámetro menor). - 42 -

Figura 17. Parámetros zoométricos. A) Media \pm E.E. del peso corporal (g) de las hembras LE y OZDF. B) Media \pm E.E. del promedio de la circunferencia abdominal (cm) de las hembras LE y OZDF. C) Media \pm E.E. del peso (mg) de grasa pélvica y abdominal de las hembras LE y OZDF. D) Imágenes representativas del proceso de autopsia. a) Organismo Long Evans, b) Organismo Zucker Obeso, en las imágenes se puede observar la diferencia entre el tejido adiposo abdominal y pélvico en cada organismo, observándose un mayor porcentaje de este en el organismo Zucker Obeso. E) Media \pm E.E. del índice de adiposidad de las hembras LE y OZDF, n=4 por grupo (C, V, L1, L2 y L3), *p <0.05 LE vs OZDF (prueba ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Tukey). Abreviaturas: C = control; V = vehículo; L1 = leuprolide 1.25 μ g/rata; L2 = leuprolide 2.5 μ g/rata; L3 = leuprolide 5 μ g/rata. - 47 -

Figura 18. Perfil metabólico. A) Media \pm E.E. de niveles de glucosa sérica en las hembras LE y OZDF. B) Media \pm E.E. de niveles de triglicéridos séricos en las hembras LE y OZDF. C) Media \pm E.E. de niveles de colesterol sérico en las hembras LE y OZDF n=4 por grupo (C, V, L1, L2 y L3), *p<0.05 LE vs OZDF (prueba ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Tukey). α p<0.05 OZDF+C vs OZDF+L2 (prueba t-student). Abreviaturas: C = control; V = vehículo; L1 = leuprolide 1.25 μ g/rata; L2 = leuprolide 2.5 μ g/rata; L3 = leuprolide 5 μ g/rata. - 49 -

Figura 19. Peso relativo de órganos. A) Media \pm E.E. del peso (mg) de hipófisis (H) de las hembras LE y OZDF B) Media \pm E.E. del peso (mg) de la glándula adrenal derecha (AD) de las hembras LE y OZDF C) Media \pm E.E. del peso (mg) de la glándula adrenal derecha (AI) de las hembras LE y OZDF n=4 por grupo (C, V, L1, L2 y L3) *p<0.05 LE vs OZDF (prueba ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Tukey). Abreviaturas: C = control; V = vehículo; L1 = leuprolide 1.25 μ g/rata; L2 = leuprolide 2.5 μ g/rata; L3 = leuprolide 5 μ g/rata. - 51 -

Figura 20. Peso relativo de órganos reproductivos. A) Media \pm E.E. del peso (mg) del ovario derecho (OD) de las hembras LE y OZDF *p<0.05 LE vs OZDF (prueba ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey) α p<0.05 LE+V vs LE+C (prueba t-student). B) Media \pm E.E. del peso (mg) del ovario izquierdo (OI) de las hembras LE y OZDF C) Media \pm E.E. de masa ovárica (mg) de las hembras LE y OZDF. D) Media \pm E.E. del peso (mg) uterino de las hembras LE y OZDF n=4 por grupo (C, V, L1, L2 y L3), *p<0.05 LE vs

OZDF (prueba ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Tukey) $\alpha p < 0.05$ LE+C y LE+V 2 vs LE+L1, LE+L2 y LE+L3 (prueba t-student). $\diamond p < 0.05$ OZDF+C y OZDF+V vs OZDF+L1, OZDF+L2 y OZDF+L3 (prueba t-student). Abreviaturas: C = control; V = vehículo; L1 = leuprolide 1.25 $\mu\text{g/rata}$; L2 = leuprolide 2.5 $\mu\text{g/rata}$; L3 = leuprolide 5 $\mu\text{g/rata}$ - 53 -

Figura 21. Cortes histológicos de ovario representativos de ratas hembra LE y OZDF (CL: cuerpo lúteo). Abreviaturas: C = control; V = vehículo; L1 = leuprolide 1.25 $\mu\text{g/rata}$; L2 = leuprolide 2.5 $\mu\text{g/rata}$; L3 = leuprolide 5 $\mu\text{g/rata}$ - 57 -

Figura 22. Cortes histológicos de útero representativos de ratas hembra LE y OZDF. Abreviaturas: C = control; V = vehículo; L1 = leuprolide 1.25 $\mu\text{g/rata}$; L2 = leuprolide 2.5 $\mu\text{g/rata}$; L3 = leuprolide 5 $\mu\text{g/rata}$ - 59 -

Figura 23. Gráfico concentración-respuesta de la administración de LEU en ratas Zucker obesas adultas. - 60 -

Figura 24. Parámetros zoométricos administración de LEU por 21 días. A) Media \pm E.E. del peso corporal (g) de las hembras LE y OZDF. B) Media \pm E.E. del promedio de la circunferencia abdominal (cm) de las hembras LE y OZDF. C) Media \pm E.E. de peso (mg) de grasa pélvica y abdominal de las hembras LE y OZDF. D) Media \pm E.E. del índice de adiposidad de las hembras LE y OZDF. E) Media \pm E.E. del consumo de alimento (gr) de las hembras LE y OZDF, n=6 por grupo (C,V y L), $*p < 0.05$ LE vs OZDF (prueba ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Tukey). Abreviaturas: C = control; V = vehículo; L= leuprolide 2.5 $\mu\text{g/rata}$ - 64 -

Figura 25. Perfil metabólico administración de LEU por 21 días. A) Media \pm E.E. de niveles de glucosa sérica en las hembras LE y OZDF. B) Media \pm E.E. de niveles de triglicéridos séricos en las hembras LE y OZDF. C) Media \pm E.E. de niveles de colesterol sérico en las hembras LE y OZDF n=6 por grupo (C,V y L), $*p < 0.05$ LE vs OZDF (prueba ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Tukey), $\alpha p < 0.05$ OZDF+C vs OZDF+L (prueba ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey). Abreviaturas: C = control; V = vehículo; L= leuprolide 2.5 $\mu\text{g/rata}$ - 66 -

Figura 26. Peso relativo de órganos administración de LEU por 21 días. A) Media \pm E.E. del peso (mg) de la hipófisis (H) de las hembras LE y OZDF. B) Media \pm E.E. del peso (mg) de la glándula adrenal derecha (AD) de las hembras LE y OZDF. C) Media \pm E.E. del peso (mg) de la glándula adrenal izquierda (AI) de las hembras LE y OZDF, n=6 por grupo (C, V y L) $*p < 0.05$ LE vs OZDF (prueba ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Tukey), $\alpha p < 0.05$ OZDF+C vs OZDF+L (prueba ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey). Abreviaturas: C = control; V = vehículo; L= leuprolide 2.5 $\mu\text{g/rata}$ - 67 -

Figura 27. Peso de órganos reproductivos administración de LEU por 21 días. A) Media \pm E.E. del peso (mg) del ovario derecho (OD) de las hembras LE y OZDF. B) Media \pm E.E. del peso (mg) del ovario izquierdo (OI) de las hembras LE y OZDF. C) Media \pm E.E. de masa ovárica (mg) de las hembras LE y OZDF, n=6 por grupo (control, vehículo y LEU), $*p < 0.05$ LE vs OZDF (prueba ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Tukey), $\alpha p < 0.05$ OZDF+C vs OZDF+L (prueba ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey). D) Media \pm E.E. del peso (mg) uterino de las hembras LE y OZDF n=6 por grupo (C,V y L), $\alpha p < 0.05$ LE+C y LE+V vs LE+L (prueba ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey) $\diamond p < 0.05$ OZDF+C y OZDF+V vs OZDF+L (prueba ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey). Abreviaturas: C = control; V = vehículo; L= leuprolide 2.5 $\mu\text{g/rata}$ - 69 -

Figura 28. Registro del ciclo estral en ratas Long Evans pertenecientes a tres grupos experimentales, cada uno conformado por tres animales: control (A–C), vehículo (D–F) y administración de leuprolide (G–I). Se presentan los patrones del ciclo estral obtenidos mediante citología vaginal diaria durante dos periodos consecutivos: 12 días previos al tratamiento (líneas rectas) y 12 días durante el tratamiento (líneas punteadas). En el eje vertical se representan las fases del ciclo: estro (E), proestro (P) y diestro 1 y 2 (D), mientras que en el eje horizontal se indican los días de evaluación. - 71 -

Figura 29. Registro del ciclo estral en ratas Zucker obesas pertenecientes a tres grupos experimentales, cada uno conformado por tres animales: control (A–C), vehículo (D–F) y administración de leuprolide (G–I). Se presentan los patrones del ciclo estral obtenidos mediante citología vaginal diaria durante dos periodos consecutivos: 12 días previos al tratamiento (líneas rectas) y 12 días durante el tratamiento (líneas punteadas). En el eje vertical se representan las fases del ciclo: estro (E), proestro (P) y diestro 1 y 2 (D), mientras que en el eje horizontal se indican los días de evaluación. - 72 -

Figura 30. Media \pm E.E de la duración de las fases del ciclo estral, 12 días antes y 12 días durante el tratamiento de administración de LEU por 21 días. A) Media \pm E.E. de la duración total del ciclo estral en hembras LE y OZDF. B) Media \pm E.E. de la duración de la etapa de estro en hembras LE y OZDF. C) Media \pm E.E. de la duración de la etapa de diestro 1 y 2 en hembras LE y OZDF. D) Media \pm E.E. de la duración de la etapa de proestro en hembras LE y OZDF, n=6 por grupo (control, vehículo y LEU), *p<0.05 LE vs OZDF (prueba ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Tukey), α p<0.05 OZDF+C vs OZDF+L y 05 LE+C y LE+ C vs LE+L (prueba ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey). Abreviaturas: C = control; V = vehículo; L= leuprolide 2.5 μ g/rata. - 73 -

Figura 31. Cortes histológicos de ovario representativos de ratas hembra LE y OZDF, administración de LEU por 21 días (CL: cuerpo lúteo, Q: quiste). Abreviaturas: C = control; V = vehículo; L= leuprolide 2.5 μ g/rata. - 77 -

Figura 32. Cortes histológicos de útero representativos, administración de LEU por 21 días, de ratas hembra LE y OZDF. Abreviaturas: C = control; V = vehículo; L= leuprolide 2.5 μ g/rata. - 79 -

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas de ratas que se han utilizado como modelos de obesidad inducida (Martinez Pérez, 2022; Aleixandre y Miguel, 2008).	- 23 -
Tabla 2. Agonistas de GnRH más utilizados en tratamientos para inducción de la ovulación (Bonilla, 2018; Bettahar y Pinton, 2019).	- 26 -
Tabla 3. Ejemplos de algunos estudios implementando diferentes dosis de LEU.	- 29 -
Tabla 4. Clasificación de folículos ováricos de acuerdo con Grasa <i>et al.</i> (2015).	- 41 -
Tabla 5. Longitud naso anal, longitud de la cola y longitud total (cm) en ratas hembra LE y OZDF.	- 46 -
Tabla 6. Análisis histológico de ovarios.	- 56 -
Tabla 7. Diámetro uterino y grosor endometrial.	- 58 -
Tabla 8. Longitud corporal administración de LEU por 21 días.	- 61 -
Tabla 9. Análisis histológico de ovarios administración de LEU por 21 días.	- 76 -
Tabla 10. Diámetro uterino y grosor endometrial, administración de LEU por 21 días.	- 78 -

GLOSARIO

17β-HSD1	17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1
17β-HSD5	17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 5
3β-HSD	Enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
AMH	Hormona antimülleriana
ARC	Núcleo arcuato
CYP11A1	Enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol
CYP17A1	Enzima esteroide 17-alfa-monooxigenasa
CYP19A1	Aromatasa
E2	Estradiol
ER	Receptor de estrógeno
FIV	Fecundación <i>in vitro</i>
FSH	Hormona foliculoestimulante
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
GnRHR	Receptor de GnRH
hCG	Gonadotropina coriónica humana
HHG	Eje hipotálamo-hipófisis-gónada
IMC	Índice de masa corporal
LEU	Acetato de leuprolide
LH	Hormona luteinizante
P4	Progesterona
SHBG	Globulina transportadora de hormonas sexuales
SHO	Síndrome de hiperestimulación ovárica
SOP	Síndrome de ovario poliquístico
StAR	Proteína reguladora aguda esteroideogénica
TAB	Tejido adiposo blanco
TNF- α	Factor de necrosis tumoral
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF-

RESUMEN

La obesidad se ha convertido en una epidemia mundial que afecta a un número cada vez mayor de mujeres en edad reproductiva y se ha demostrado que es un factor de riesgo para una serie de resultados adversos para la salud femenina. Las mujeres con obesidad enfrentan un mayor riesgo de complicaciones tanto maternas como fetales durante el embarazo, además de presentar una tasa reducida de éxito en procedimientos de reproducción asistida.

Dentro del campo de la reproducción asistida, una opción prometedora consiste en estimular la ovulación mediante la administración de fármacos, como los agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). Un ejemplo de estos compuestos es el acetato de leuprolide (LEU). Sin embargo, existe una cantidad limitada de investigaciones que aborden específicamente sus efectos en organismos con obesidad. Por otro lado, la utilización de animales de laboratorio, como la rata Zucker obesa, ha demostrado ser valiosa en la investigación de tratamientos para afecciones relacionadas con la obesidad y la infertilidad.

El objetivo del presente estudio fue analizar el efecto del LEU sobre la función ovárica y el grosor endometrial en ratas hembra Zucker obesas adultas. Se diseñó un modelo experimental en dos fases: una curva de concentración-respuesta (1.5, 2.5 y 5 $\mu\text{g/rata}$ por vía subcutánea durante 3 días) para determinar la dosis óptima, y un tratamiento prolongado con la dosis más efectiva (2.5 $\mu\text{g/rata}$ durante 21 días). Se evaluaron parámetros zométricos, metabólicos (glucosa, triglicéridos y colesterol), morfología ovárica y uterina, así como la dinámica del ciclo estral.

Los resultados demostraron que la dosis efectiva 50 fue la de 2.5 $\mu\text{g/rata}$ debido a que mostro ser la más eficaz para mejorar la función ovárica en ratas obesas, incrementando significativamente el número de folículos sanos, cuerpos lúteos y restaurando parcialmente la ciclicidad estral. En contraste, dosis más altas indujeron atresia folicular en ratas con normopeso. A nivel uterino, el tratamiento con LEU redujo el diámetro uterino y el grosor endometrial tanto en animales delgados como obesos; sin embargo, la disminución fue más marcada y significativa en ratas con normopeso, sugiriendo una posible resistencia uterina en organismos obesos. En el plano metabólico, el tratamiento corto con LEU no modificó los niveles de glucosa ni de lípidos; sin embargo, la administración prolongada produjo una reducción significativa del colesterol total en ratas obesas.

En conclusión, el acetato de leuprolide, a una dosis óptima de 2.5 $\mu\text{g/rata}$, administrado diariamente por 21 días, mejora parámetros reproductivos en ratas Zucker obesas sin alterar negativamente el metabolismo glucídico ni el peso corporal y podría representar una alternativa terapéutica en contextos de infertilidad asociada a obesidad. Estos hallazgos refuerzan el potencial del LEU como herramienta farmacológica en modelos de disfunción ovárica y respaldan futuras investigaciones para validar su eficacia y seguridad en humanos.

Palabras clave: Obesidad, Infertilidad, Función reproductiva, Morfología ovárica, Grosor endometrial

INTRODUCCIÓN

La obesidad es definida como una enfermedad crónica que se caracteriza por un exceso de grasa corporal y a menudo, en los seres humanos, esta se estima mediante el índice de masa corporal (IMC) calculado como el peso corporal dividido por la altura en metros al cuadrado. Un IMC de 30 kg/m² es usado comúnmente para diagnosticar obesidad en humanos (Practice Committee of ASRM, 2021). En mujeres, la obesidad suele producir una serie de alteraciones en el sistema reproductor, se han reportado casos en donde se observa un mayor número de folículos atrésicos y un aumento de la hialinización ovárica, (Bray, 1997) disfunción ovulatoria, infertilidad anovulatoria, trastornos menstruales, respuesta ovárica reducida a los agentes que inducen la ovulación, alteración de la función del ovocito y del endometrio. A su vez las mujeres con obesidad tienen mayor riesgo de desarrollar complicaciones maternas y fetales durante el embarazo; así como una menor tasa de natalidad después de un procedimiento de fecundación in vitro (FIV) (Broughton y Moley, 2017; Brewer y Balen, 2010; Practice Committee of ASRM, 2021).

El uso de animales de laboratorio como modelos de estudio en diversas patologías, como la obesidad y la infertilidad, ha resultado de gran utilidad en la búsqueda de tratamientos viables a dichas afecciones. Un ejemplo de ello es el empleo de modelos murinos de obesidad genética, entre los que destaca la rata Zucker obesa (Aleixandre y Miguel, 2008).

Un ejemplo de ello es el empleo de murinos genéticamente modificados, como la rata Zucker obesa (Aleixandre y Miguel, 2008).

Dentro de las alternativas de tratamiento en el ámbito de la reproducción asistida, una opción viable consiste en la estimulación de la ovulación mediante la administración de fármacos, como los agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). Un ejemplo de estos compuestos es el acetato de leuprolide (LEU). Sin embargo, se han realizado pocas investigaciones sobre sus efectos en organismos con obesidad (Wilson *et al.*, 2007; Schally *et al.*, 2001; Crosignani *et al.*, 2003).

El propósito de esta investigación es evaluar el uso de LEU como agonista de GnRH en ratas Zucker obesas, con el fin de determinar si dicho tratamiento puede ser una alternativa viable para estimular las funciones ováricas y el engrosamiento del revestimiento endometrial, para ello se plantearon dos experimentos, el primero para determinar la dosis con mayores efectos benéficos en términos reproductivos, administrando de manera aguda 3 diferentes dosis de LEU. El segundo experimento consistió en evaluar los efectos de la administración crónica de la dosis de mayor efecto obtenida en el experimento inicial, sobre la salud metabólica y reproductiva de la rata Zucker obesa.

MARCO TEÓRICO

Eje hipotálamo-hipófisis-ovario

El eje hipotálamo-hipófisis-gónada es un modelo fundamental propuesto por Geoffrey Harris en 1955 para el control neuroendocrino de la función gonadal, el cual controla la función reproductiva en los vertebrados y garantiza la maduración adecuada de las células germinales y la coordinación de su liberación con las condiciones ambientales internas y externas adecuadas. El eje hipotálamo-hipófisis-gónada involucra tres niveles anatómicos: hipotálamo, glándula pituitaria y las gónadas (Clément *et al.*, 2020; Plant, 2015).

En el caso de la especie humana, en el hipotálamo de las mujeres más o menos cada hora, las neuronas localizadas en el núcleo arcuato (ARC) liberan la hormona GnRH en forma pulsátil a la circulación (Pacheco, 2010). En la rata, el hipotálamo genera una señal neuronal diaria recurrente durante un breve período crítico en la fase de luz del ciclo de 24 h y el día del proestro, es responsable de provocar la activación preovulatoria y aumento de gonadotropinas en la hipófisis (Plant, 2015).

A nivel de la hipófisis anterior, los gonadotropos liberan dos gonadotropinas diferentes, hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) en respuesta a la GnRH. La codificación de la señal de GnRH en forma de pulsos se conserva a nivel de gonadotropos, a pesar de la corta vida media de la GnRH, gracias a la existencia de un sistema sanguíneo portal exclusivo. Los cambios en la frecuencia del pulso de GnRH, como los generados por el entorno variable de esteroides a lo largo de un ciclo ovárico, se asocian con la liberación preferencial de FSH o LH (Clément *et al.*, 2020).

El nivel gonadal involucra dos tipos de células que responden a las gonadotropinas, las cuales conforman los folículos ováricos, las células de la teca y células de la granulosa. Las células de la teca de los ovarios son células esteroidogénicas que responden a la LH; por otro lado, las células de la granulosa de los ovarios responden a la FSH y apoyan la maduración de las células germinales, también son capaces de sintetizar hormonas peptídicas y participar en la biosíntesis de esteroides en coordinación con las células de la teca (Clément *et al.*, 2020; Plant, 2015).

Los esteroides gonadales como la progesterona (P4) y el estradiol (E2) modulan a su vez la secreción de GnRH y gonadotropinas, mientras que las hormonas peptídicas como la inhibina actúan principalmente sobre los gonadotropos. Además, debido a la remodelación permanente de los ovarios inducida por el desarrollo de los folículos a lo largo de la vida reproductiva, el tamaño del conjunto disponible de células hormonalmente activas es muy dinámico (Clément *et al.*, 2020; Plant, 2015).

La actividad cíclica del eje hipotálamo-hipófisis-gónada se caracteriza por la secreción tónica de niveles relativamente bajos de LH y FSH desde la hipófisis anterior, los cuales se ven interrumpidos por aumentos súbitos de gonadotropinas que desencadenan la ovulación: cada 4 a 5 días en ratas y cada 28 días en mujeres. Durante la fase folicular, esta secreción tónica de gonadotropinas, que impulsa la foliculogénesis, está regulada por un circuito de retroalimentación negativa, en concordancia con el modelo de Harris (Plant, 2015).

El principal componente ovárico en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada es el estradiol secretado por los folículos en desarrollo contribuyendo a la retroalimentación negativa del mismo, dicha retroalimentación ocurre tanto a nivel de la hipófisis como del hipotálamo. A nivel hipotalámico, la retroalimentación

negativa del estradiol principalmente modula la amplitud de la liberación pulsátil de GnRH. Existen dos receptores nucleares de estrógeno (ER), ER α y ER β , y estudios con ratones knockout para estas proteínas indican que ER α es quien modula la acción de retroalimentación negativa del E2 (Clarkson *et al.*, 2017; Plant, 2015).

La retroalimentación del E2 sobre la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal está mediada indirectamente a través de neuronas Kiss1, ya que las neuronas GnRH no expresan receptores ER α . La retroalimentación negativa ocurre principalmente en el núcleo arcuato (ARC), donde las neuronas Kiss1 responden a niveles bajos de E2 inhibiendo la secreción pulsátil de GnRH. En este contexto, se ha informado recientemente que las neuronas coexpresoras de kisspeptina, neuroquinina B y dinorfina (KNDy) en el ARC desempeñan un papel clave en la regulación de esta retroalimentación negativa (Mittelman-Smith *et al.*, 2012; Constantin, 2022). Por otro lado, la retroalimentación positiva ocurre en el núcleo anteroventral periventricular (AVPV), donde niveles elevados de E2 estimulan la actividad de las neuronas Kiss1, promoviendo la descarga preovulatoria de GnRH y subsecuentemente de LH (Clarkson y Herbison, 2009).

Además de la retroalimentación negativa del estradiol y la progesterona, existe otra retroalimentación negativa de las inhibinas y un efecto estimulante positivo de las activinas, ambas hormonas producidas en los ovarios. Las inhibinas son hormonas glicoproteicas diméricas que suprimen la FSH a través de un efecto directo en la hipófisis. Las activinas son dímeros que actúan principalmente a nivel local de forma paracrina o autocrina (Mansel *et al.*, 2009).

En resumen, el hipotálamo secreta GnRH de manera pulsátil, actúa sobre los gonadotropos de la hipófisis anterior, que expresan receptores de GnRH, para señalar tanto la síntesis como la secreción de las hormonas gonadotropinas: LH y FSH, desde la hipófisis a la circulación. Debido a su participación en la regulación directa de la LH, FSH y a su vez, de la producción de esteroides sexuales y la gametogénesis, la GnRH desempeña un papel central tanto en la función reproductora como en el control hormonal general a través de la regulación precisa del eje hipotálamo-hipófisis-gónada (Figura 1).

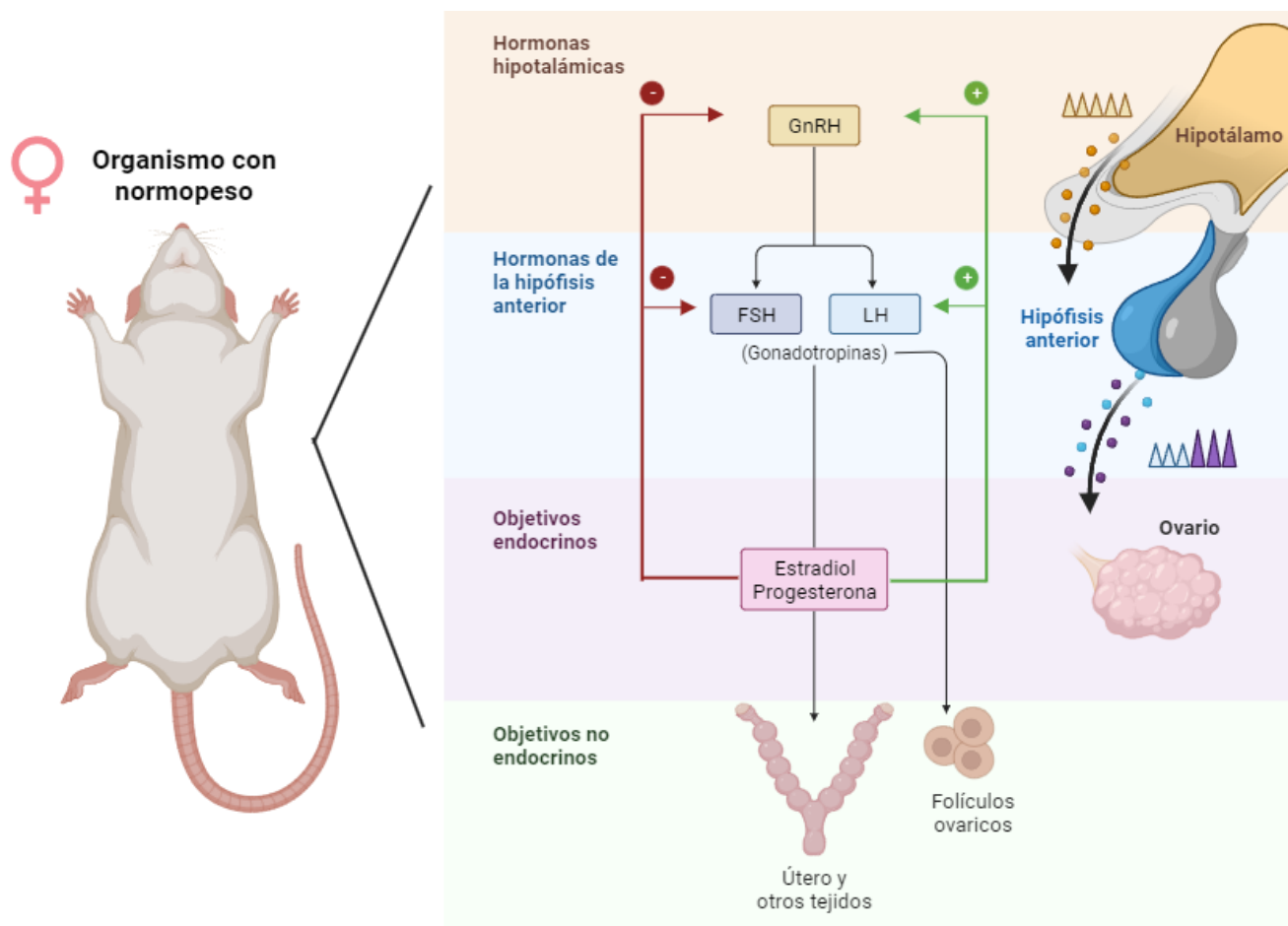


Figura 1. Esquematación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada en ratona hembra con normopeso. Elaborado en BioRender por Natalia Martínez García de múltiples fuentes (Clément *et al.*, 2020; Plant, 2015; Rance *et al.*, 2010; Clarkson *et al.*, 2017; Pacheco, 2010).

Ovario

El ovario de los mamíferos tiene dos funciones, la esteroidogénesis y la gametogénesis. Estas funciones dependen de la actividad de los folículos ováricos que están formados por el ovocito, las células foliculares o de la granulosa y las células tecales; a su vez la actividad y el desarrollo de los folículos ováricos están regulados por gonadotropinas a través de los mecanismos del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. Durante el desarrollo folicular, las células de la teca y la granulosa adquieren funciones endocrinas específicas, participando activamente en la síntesis y secreción de esteroides sexuales como estrógenos, progestinas y andrógenos, así como de glicoproteínas reguladoras como activina e inhibina (Shimizu, 2016 y Clément *et al.*, 2020).

En los mamíferos, los ovarios están presentes en la cavidad pélvica superior a ambos lados del cuerpo y se mantienen en su lugar mediante un mesenterio conectado a un ligamento ancho. Tiene tres regiones principales: el hilio, la corteza externa y la médula central (Lew, 2019; Puttabyatappa y Padmanabhan, 2018).

- I. El hilio contiene vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervios, células del hilio y es el punto en el que el ovario se une al mesovario.
- II. La corteza ovárica tiene una zona exterior (túnica albugínea) y una zona interior donde los folículos ováricos están incrustados dentro del tejido estromal.
- III. La médula es el espacio central del órgano conformado por tejido conectivo laxo, rico en fibras elásticas, vasos sanguíneos, linfáticos y nervios asociados los cuales atraviesan el tejido conectivo. Está rodeada por la corteza ovárica excepto a nivel de la inserción del mesovario.

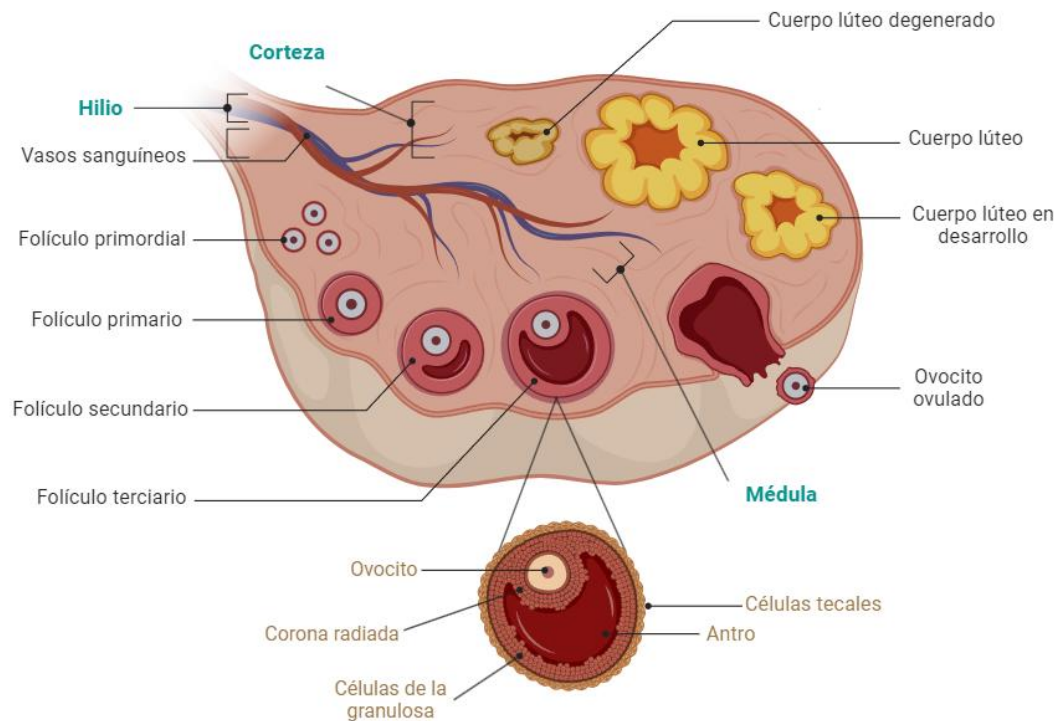


Figura 2. Esquema de la anatomía ovárica en donde se muestran las tres regiones principales que lo conforman (hilio, corteza externa y médula central), así como los diferentes estadios de los folículos ováricos. Elaborado en BioRender por Natalia Martínez García de múltiples fuentes (Lew, 2019; Puttabyatappa y Padmanabhan, 2018).

Desarrollo folicular

En los ovarios de los mamíferos, los folículos están constituidos por un ovocito interno, rodeado de células de la granulosa y capas externas de células tecales. El desarrollo de cada folículo está regulado tanto por factores endocrinos como paracrinos (McGee y Hsueh, 2000). En humanos, la formación folicular (foliculogénesis) ocurre aproximadamente a las 20 semanas de gestación, mientras que en roedores este proceso inicia alrededor del tercer día postnatal (Puttabyatappa y Padmanabhan, 2018; Lee *et al.*, 2021).

Una vez formados, los folículos no permanecen estáticos, sino que atraviesan fases de activación y crecimiento. Este proceso, conocido como reclutamiento folicular, puede presentarse en dos modalidades: inicial y cíclica. El reclutamiento inicial corresponde a la activación continua de folículos primordiales latentes, los cuales se incorporan progresivamente al conjunto de folículos en crecimiento. En cambio, el reclutamiento cíclico ocurre durante cada ciclo reproductivo, cuando el aumento de FSH circulante estimula el crecimiento de una cohorte de folículos antrales (McGee y Hsueh, 2000).

Durante el reclutamiento inicial, diversos factores intraováricos —como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la hormona antimülleriana (AMH) y el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1)— promueven el crecimiento de algunos folículos primordiales, mientras que otros permanecen en reposo durante meses o incluso años (Hsueh *et al.*, 2015; Skinner, 2005; Gougeon, 2010). Alternativamente, este proceso puede deberse a la liberación de señales inhibitorias que mantienen a los folículos detenidos en la profase de la meiosis. En cualquier caso, se considera que el reclutamiento inicial es un proceso continuo que comienza poco después de la formación del folículo, mucho antes del inicio de la pubertad (McGee y Hsueh, 2000).

Por su parte, el reclutamiento cíclico inicia tras la pubertad y depende de los aumentos periódicos de FSH durante cada ciclo reproductivo. En roedores, los folículos antrales tempranos reclutables presentan diámetros de 0,2 a 0,4 mm mientras que en humanos alcanzan entre 2 y 5 mm. En esta fase, solo un número reducido de folículos sobrevive, mientras que la mayoría sigue la vía de la atresia, tanto en roedores como en humanos (Trounson *et al.*, 1998).

En estos folículos, los ovocitos han completado su crecimiento, adquirido la zona pelúcida y alcanzado la competencia necesaria para reanudar la meiosis (Li y Chian, 2017). El reclutamiento cíclico y la selección folicular en roedores es comparable al de los primates; sin embargo, en los primeros suelen seleccionarse múltiples folículos dominantes durante cada ciclo estral, a diferencia de lo que ocurre en los humanos (McGee y Hsueh, 2000) (Figura 3).

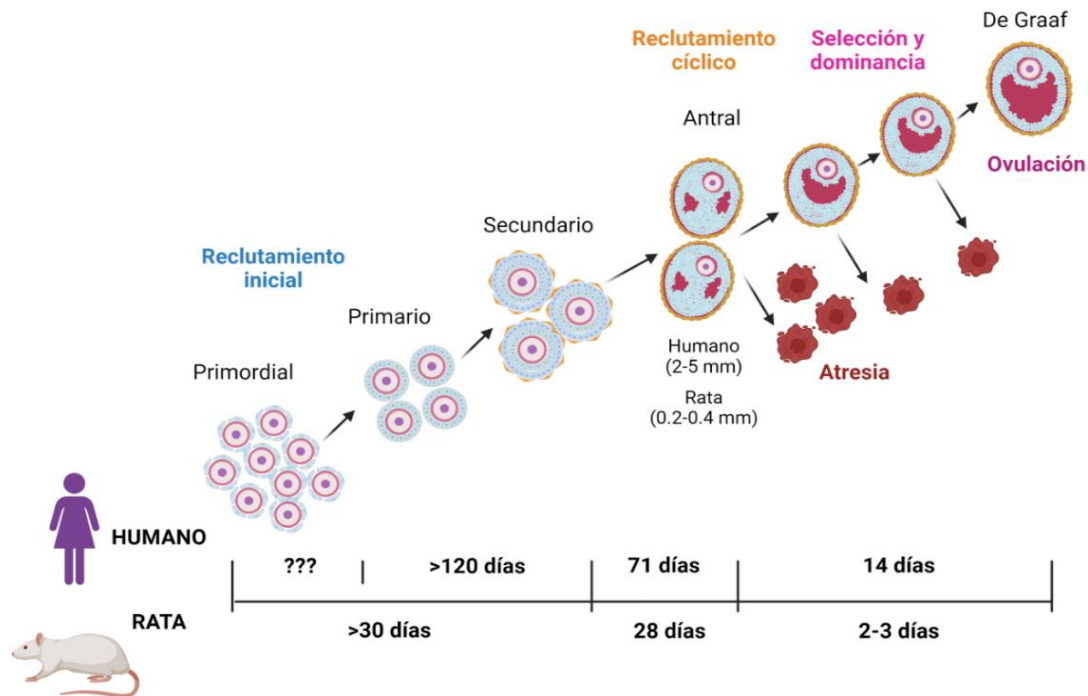


Figura 3. Esquematización del proceso de reclutamiento y selección folicular en ovarios humanos y de rata. En humanos, el desarrollo desde el folículo primordial hasta la ovulación ocurre en periodos prolongados: >120 días hasta el estadio secundario, ~71 días hasta el folículo antral y 14 días para el proceso de selección y dominancia que culmina con la ovulación. En ratas, los tiempos son más cortos: >30 días desde el estadio primordial al secundario, 28 días hasta el folículo antral y 2-3 días para alcanzar la ovulación. Elaborado en BioRender por Natalia Martínez García y modificado de McGee y Hsueh (2000).

Finalmente, la foliculogénesis comprende el desarrollo de los folículos ováricos desde su estadio primordial hasta su forma madura, el folículo de Graaf. Este proceso implica un incremento progresivo del tamaño y la diferenciación celular, que culmina con la ovulación. El desarrollo folicular comienza cuando los folículos en reposo abandonan la reserva ovárica y finaliza con la producción de un único folículo dominante en cada ciclo menstrual. Dicho proceso puede dividirse en cuatro etapas principales: iniciación, crecimiento temprano del folículo, selección de un folículo dentro de la cohorte reclutada y maduración del folículo preovulatorio (Gougeon, 2010).

En el desarrollo folicular, la primera fase preantral está dirigida por factores de crecimiento locales a través de mecanismos autocrinos/paracrinos, mientras que la segunda fase de desarrollo depende de las gonadotropinas y continúa hasta el punto final de la ovulación o la atresia folicular (Lew, 2019). Las etapas del desarrollo folicular definidas por el tamaño del folículo, el número de células en la envoltura folicular y su morfología, se pueden clasificar en etapa de folículo primordial, primario, secundario y antral (Hertig y Adams, 1967) (Figura 4).

I. Folículo primordial

El folículo primordial es una estructura que envuelve un pequeño ovocito primario dentro de una sola capa de células escamosas de la granulosa en la lámina basal, se encuentran principalmente en la corteza del ovario, rodeados de abundante matriz extracelular. No existe contacto directo entre las células de los folículos primordiales y otras células. Los folículos primordiales carecen de suministro de sangre independiente y su acceso al sistema

endocrino es muy limitado. Se ha implicado que los factores paracrinos y autocrinos intrínsecos son importantes para mantener la mayoría de los folículos primordiales en estado de reposo, resistiendo así el reclutamiento y ayudando al mantenimiento de la reserva ovárica (Lew, 2019; Biswas *et al.*, 2022).

II. Folículo primario

El folículo primario está constituido por un ovocito rodeado por una sola capa de células de la granulosa cuboidales. Sus principales eventos de desarrollo son el crecimiento y la diferenciación de los ovocitos y la expresión del receptor de FSH en las células de la granulosa. El reclutamiento folicular y las etapas iniciales de crecimiento son independientes de las gonadotropinas, pero la FSH es necesaria para la transición folicular de la etapa primaria a la preantral. Los niveles plasmáticos más altos de FSH aceleran el desarrollo del folículo primario. El genoma del ovocito se reactiva, lo que resulta en el crecimiento del ovocito y el desarrollo de la zona pelúcida, una capa circundante de matriz extracelular (Oktay, Briggs y Gosden, 1997; Fortune *et al.*, 2000; Lew, 2019).

III. Folículo secundario

La transición de un folículo primario a uno secundario está influenciada por una serie de factores locales y sistémicos, incluyendo el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1), la activina, la hormona antimülleriana (AMH) y niveles basales de gonadotropinas (Knight y Glistler, 2006; McGee y Hsueh, 2000). Durante este proceso, el ovocito experimenta un crecimiento completo, pero la meiosis permanece en estado de suspensión. A nivel histológico, las células de la granulosa evolucionan de un epitelio cúbico simple a un epitelio columnar estratificado. Además, se desarrollan las dos capas primarias de teca interna y teca externa. La angiogénesis facilita la circulación sanguínea alrededor del folículo, lo que lo expone a influencias externas, incluyendo nutrientes y gonadotropinas. También es importante mencionar que la teca externa adquiere inervación autónoma en este proceso (Lew, 2019; Gougeon, 2010).

Los folículos secundarios se caracterizan por la presencia de un ovocito completamente desarrollado rodeado por una zona pelúcida, de cinco a ocho capas de células de la granulosa, una lámina basal y una teca interna y externa con vasos sanguíneos asociados (Lew, 2019).

En este estadio, las células de la granulosa tienen receptores a FSH; la unión de la hormona a su receptor estimula la mitosis de las células, lo que provoca un aumento del tamaño del folículo. Conforme crece el folículo, aumenta la actividad de las células, lo que resulta en un aumento del líquido folicular que contiene glucosaminoglucanos, proteoglucanos, así como P4, E2, inhibina, folistatina y activina, las cuales regulan la liberación de LH y FSH (Gartner y Hiatt, 2007).

IV. Folículo antral

Un folículo antral desarrolla un "antro", cavidad que contiene líquido folicular, un exudado plasmático que funciona como un microambiente regulador de los productos secretores

tanto del ovocito como de las células de la granulosa. El número relativo y el tamaño de los folículos antrales varían entre individuos y en función de la edad y la etapa del ciclo menstrual-estral (Lew, 2019; Erickson y Shimasaki, 2000).

Las células intersticiales de la teca expresan receptores de LH e insulina y tienen una red capilar que rodea a los folículos antrales. Las células de la granulosa de los folículos antrales se diferencian en subtipos influenciados por su posición: membrana, área periantral y cúmulo oóforo. Todos los subtipos expresan receptores de FSH, pero los subtipos de células de la granulosa tienen una respuesta diferencial a la estimulación de FSH, lo que influye en la esteroidogénesis y la expresión del receptor de LH (Erickson y Shimasaki, 2000).

El último estadio del proceso de foliculogénesis es el folículo de Graaf (denominado así exclusivamente en mujeres), o también llamado folículo preovulatorio, en el cual se observa al ovocito en el cúmulo oóforo y a su vez se encuentra rodeado por la corona radiada, la cual se forma a partir de células de la granulosa altamente diferenciadas, que proporcionan nutrientes y factores necesarios para el crecimiento del ovocito (Gartner y Hiatt, 2007).

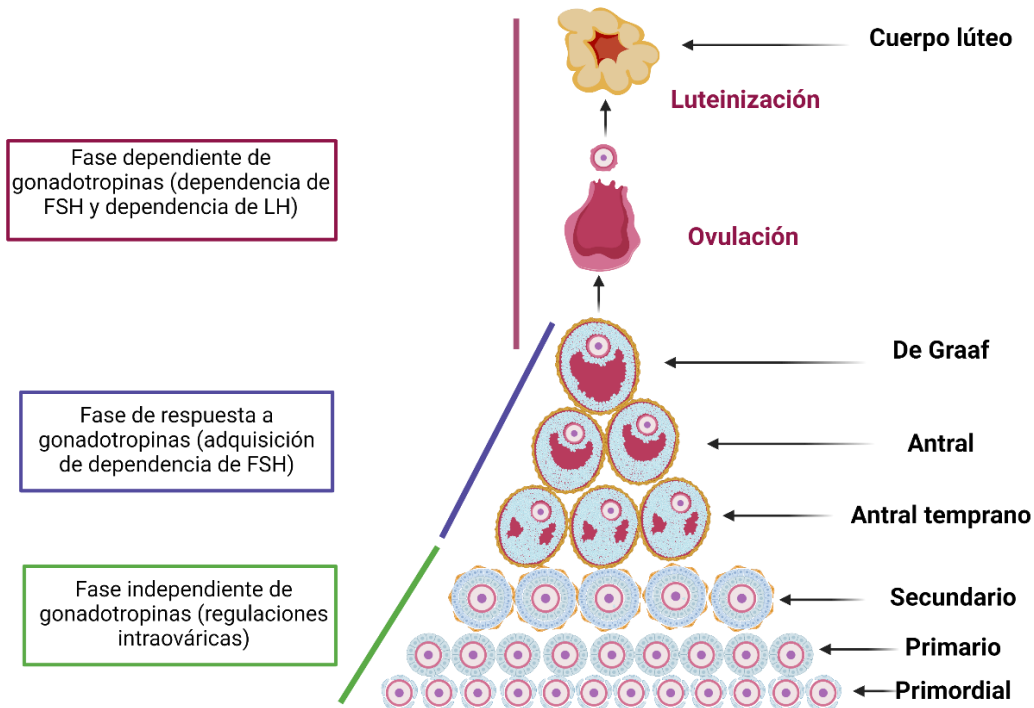


Figura 4. Representación esquemática del desarrollo del folículo ovárico y la ovulación. Elaborado en BioRender por Natalia Martínez García de múltiples fuentes (Lee *et al.*, 2019; McGee y Hsueh, 2000).

Selección final del folículo

La "selección" de folículos es el proceso mediante el cual se elige un único folículo "dominante" de la cohorte reclutada para un crecimiento preferencial o bien múltiples folículos dominantes en el caso de especies poliovulatorias como los roedores (Block, 1951; Hodgen, 1982; Gougeon, 1986; Ginther *et al.*, 2001). En general, se ha documentado que la selección de folículos ocurre una vez en la fase folicular temprana, a la mitad del ciclo menstrual, lo que lleva a la ovulación (Pache *et al.*, 1990; Zeleznik, 2004; Baerwald, Adams y Pierson, 2012) (Figura 4).

Después de aumentos en la FSH circulante durante el período perimenstrual, una cohorte de folículos antrales escapa a la apoptosis debido a la acción de supervivencia de la FSH. Entre este grupo de aproximadamente diez folículos antrales (que se encuentran en adultos jóvenes), uno de los folículos principales crece más rápido que el resto de la cohorte y produce niveles más altos de estrógenos e inhibinas (McGee y Hsueh, 2000).

Aunque las razones exactas por las que un folículo emerge como dominante no están claras, es probable que este folículo sea más sensible a la FSH (Fauser y Van Heusden, 1997), tal vez debido a una mayor expresión del receptor de FSH y/o LH o aumentos en los factores de crecimiento locales que aumentan la capacidad de respuesta de la FSH (McGee y Hsueh, 2000). Los estrógenos y las inhibinas producidos por el folículo más grande suprimen la FSH hipofisaria liberada durante la fase folicular media. Como resultado, los folículos antrales en crecimiento restantes se ven privados de la estimulación adecuada con FSH necesaria para su supervivencia (diZerega y Hodgen, 1981).

Por lo tanto, la selección negativa contra los folículos subordinados es el resultado de que el estrógeno y la inhibina producidos por el folículo dominante ejercen una retroalimentación negativa sobre la liberación de gonadotropinas. Además, este folículo de rápido crecimiento también produce niveles más altos de factores de crecimiento autocrinos y paracrinos que estimulan aumentos en la vasculatura y la capacidad de respuesta de la FSH, constituyendo así un mecanismo de selección positiva local (McGee y Hsueh, 2000).

Las especies que son monoovulatorias y las que son poliovulatorias probablemente presenten diferencias en el umbral o punto de ajuste para las señales de retroalimentación negativa. Se presume que este rasgo está influenciado genéticamente (Spearow, 1986). Además, las disparidades entre especies y cepas en la capacidad de respuesta folicular a la FSH, así como el número de folículos antrales en crecimiento disponibles, también pueden desempeñar un papel en la determinación de la cantidad de folículos de tamaño preovulatorio (McGee y Hsueh, 2000).

Ovulación

La ovulación implica la liberación del ovocito, que ha completado las etapas finales de maduración, la reanudación de la meiosis y la ruptura de la vesícula germinal (Puttabyatappa y Padmanabhan, 2018). Los niveles plasmáticos de estrógeno se incrementan como consecuencia del aumento en la producción de esta hormona por parte de las células de la granulosa, que adquieren actividad endocrina dentro del folículo. El estrógeno modifica entonces su función, pasando de actuar como modulador de retroalimentación negativa de la GnRH en el hipotálamo a ejercer un efecto de retroalimentación positiva (Holesh, Bass y Lord, 2023).

Este cambio provoca un aumento en la frecuencia de secreción de GnRH en la glándula pituitaria anterior, lo que conduce a un aumento de la LH. El aumento de la LH estimula la actividad de enzimas proteolíticas dentro del folículo, debilitando la pared del ovario y permitiendo la liberación del folículo maduro. También provoca la luteinización de las células tecales y de la granulosa que forman el cuerpo lúteo, responsable de los niveles de síntesis de progesterona. Una vez que el folículo se libera, es atrapado por las fimbrias de las trompas de Falopio. El ovocito permanece en la metafase II de la meiosis II listo para la fecundación (Holesh, Bass y Lord, 2023).

La neovascularización de la capa de células de la granulosa, junto con las células de la teca, invaden el antro donde se diferencian en células lúteas. La luteinización también se asocia con un cambio en la producción de la hormona principal, de E2 a P4. Tanto el proceso de ovulación como la luteinización están rigurosamente regulados por productos de los miembros de diversas familias de genes. Esto incluye proteasas que desintegran la pared folicular para facilitar la liberación de los ovocitos, factores de crecimiento epidérmico que fomentan la expansión de las células granulosas del cúmulo oóforo y proteasas que contribuyen a la descomposición de la pared folicular, permitiendo así la liberación de los ovocitos (Conti *et al.*, 2012; Richards, 2007; Stouffer, Xu y Duffy, 2007).

Atresia folicular

La atresia folicular es un proceso apoptótico regulado hormonalmente que depende predominantemente de la apoptosis de las células de la granulosa. La atresia folicular también está estrictamente inhibida por la FSH, que es beneficiosa para el desarrollo de los folículos. Una vez que el folículo se ha desarrollado, secreta estrógeno, que en niveles elevados disminuye la secreción de FSH (Kaipia y Hsueh, 1997). La atresia folicular también se ha asociado con varios sistemas ligando-receptor implicados en la muerte celular, incluido el factor de necrosis tumoral (TNF- α), el ligando Fas, el ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF- α (TRAIL), el ligando APO-3 y el ligando PFG-5 (Matsuda *et al.*, 2008; Zhou, Peng y Mei, 2019).

Aunque muchos folículos avanzan más allá de la etapa primordial, la mayoría sufre atresia. Los folículos atrésicos se caracterizan por una baja actividad mitótica, núcleos picnóticos y actividad de fosfatasa ácida dentro de la capa de células de la granulosa. La atresia de los folículos antrales se produce en tres etapas consecutivas (Byskov, 1974; Peluso y Steger, 1978). En la etapa I, hay una ligera reducción en la frecuencia de las divisiones de las células de la granulosa y aparecen núcleos picnóticos. Los folículos en la etapa II muestran una reducción adicional en el número de divisiones de células de la granulosa y se observan núcleos picnóticos y leucocitos en el antro. En el estadio III, las células de la granulosa han dejado de dividirse y la cavidad antral comienza a colapsar (Peluso y Steger, 1978).

Cuerpo lúteo

El cuerpo lúteo es una estructura endocrina transitoria que produce la progesterona necesaria para apoyar el desarrollo, la implantación y el embarazo en el útero. La función del cuerpo lúteo finaliza y su estructura involuciona mediante un proceso conocido como luteólisis, que puede ocurrir al final de un ciclo ovárico reproductivo no fecundo, en el caso del ser humano cuando se desarrolla la placenta, o al final del embarazo en otras especies. Cabe mencionar que el proceso de luteólisis puede variar según la especie, ya que algunas experimentan tanto una luteólisis funcional como estructural, resultando en la formación de cuerpos albicans cargados de tejido conectivo, mientras que, en otras especies, como los roedores, solo se someten a la luteólisis 20 funcional, lo que lleva a la presencia de muchos cuerpos

lúteos de múltiples ciclos en el ovario (Smith y Meidan, 2014; Stouffer *et al.*, 2013; Puttabyatappa y Padmanabhan, 2018).

Los cuerpos lúteos son una continuación de la maduración folicular y se forman a partir de células granulosas y de la teca interna. Después del aumento preovulatorio de gonadotropinas, las células foliculares comienzan cambios morfológicos, endocrinológicos y bioquímicos asociados con la luteinización. La luteinización implica la transición de un folículo preovulatorio a un cuerpo lúteo altamente vascularizado capaz de secretar grandes cantidades de progesterona. Además, varios tipos de células sufren hiperplasia, hipertrofia y/o migración durante la formación del cuerpo lúteo (Smith, McIntush y Smith 1994).

Un componente esencial en el desarrollo del cuerpo lúteo es la provisión de suministro sanguíneo. El proceso de establecer una nueva red microvascular incluye la ruptura de la membrana basal folicular, la migración y proliferación de células endoteliales y el desarrollo de la luz capilar. Este proceso está regulado por la interacción de sustancias angiogénicas y antiangiogénicas (Smith, McIntush y Smith 1994).

La FSH y la LH estimulan lo que queda del folículo maduro después de la ovulación para convertirse en el cuerpo lúteo. El cuerpo lúteo crece y segrega progesterona y algo de estrógeno, lo que hace que el endometrio sea más receptivo a la implantación. Si no se produce la fecundación, los niveles de progesterona/estrógeno disminuyen y el cuerpo lúteo muere formando el cuerpo albicans. Estos niveles hormonales decrecientes estimulan a la FSH para que comience a reclutar folículos para el siguiente ciclo. Si se produce la fecundación, la gonadotropina coriónica humana (hCG) producida por la placenta temprana preserva el cuerpo lúteo, manteniendo los niveles de progesterona hasta que la placenta es capaz de producir suficiente progesterona para apoyar el embarazo (Holesh, Bass y Lord, 2023).

Esteroidogénesis

Las gónadas son el sitio principal para la biosíntesis de esteroides sexuales. Al igual que las glándulas suprarrenales, los ovarios expresan enzimas esteroidogénicas específicas necesarias para la síntesis de andrógenos, estrógenos y progestágenos (Miller y Auchus, 2011; Louw-du *et al.*, 2017) (Figura 5).

La producción normal de esteroides ováricos es un proceso complejo y estrictamente regulado que involucra varias vías de señalización en múltiples tipos de células. La esteroidogénesis en la mayoría de los mamíferos (incluidos humanos y ratones) parece ocurrir a través del modelo de dos células/dos gonadotropinas mediante el cual los andrógenos se sintetizan a partir del colesterol en las células de la teca estimuladas por la LH, seguido de la conversión a estrógenos en las células de la granulosa expuestas a la FSH (Louw-du *et al.*, 2017).

La biosíntesis *de novo* de todas las hormonas esteroides comienza con la enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol (P450_{scc} o CYP11A1), que convierte el colesterol en el esteroide Δ^5 C21-pregnenolona, la cual a su vez sirve como precursor inicial para la biosíntesis posterior de los mineralocorticoides, glucocorticoides y esteroides sexuales (Louw-du *et al.*, 2017). La síntesis de esteroides se inicia cuando el colesterol se transporta desde la membrana mitocondrial externa hasta la membrana mitocondrial interna, con la ayuda de la proteína reguladora aguda esteroidogénica (StAR) (Jamnongjit y Hammes, 2006).

Los receptores de LH y la enzima esteroide 17-alfa-monooxigenasa (CYP17A1), que convierte la pregnenolona y la progesterona en dehidroepiandrosterona (DHEA) y androstenediona, respectivamente; se expresan principalmente en las células de la teca, mientras que los receptores de FSH y la aromatasa (CYP19A1), que convierte los andrógenos en estrógenos, se expresan principalmente en las células de la granulosa. En particular, los receptores de LH no se encuentran exclusivamente en las células de la teca, ya que se ha observado que sus niveles de expresión en las células de la granulosa aumentan en respuesta a la FSH justo antes del aumento de LH (Louw-du *et al.*, 2017; Jamnongjit y Hammes, 2006).

Tanto las células de la teca como las de la granulosa expresan la proteína StAR, enzima CYP11A1 y enzima 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD). Por lo tanto, ambos tipos de células son capaces de producir pregnenolona y/o progesterona a partir del colesterol. Sin embargo, en la fase folicular, las células de la granulosa relativamente avascularizadas tienen una cantidad limitada de oxígeno o colesterol, por lo que se producen bajas cantidades de estos esteroides. Por el contrario, después de la exposición a las gonadotropinas, las células de la granulosa se luteinizan y luego pueden sintetizar grandes cantidades de pregnenolona y progesterona a partir del colesterol (Wood y Strauss, 2002). En particular, dado que las células de la granulosa carecen de CYP17A1, no pueden metabolizar las progestinas a andrógenos, como ocurriría en las células de la teca que expresan CYP17A1. Por lo tanto, la mayor parte de la producción de progesterona ovárica probablemente proviene de las células de la granulosa y no de la teca (Christenson y Strauss, 2000; Stocco, 2001).

El estrógeno se sintetizará mediante reacciones enzimáticas específicas catalizadas por CYP19A1 y 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (17βHSD1) en células de la granulosa, mientras que en las células de la teca se convertirá en testosterona mediante 17β hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 5 (17βHSD5) (Louw-du *et al.*, 2017).

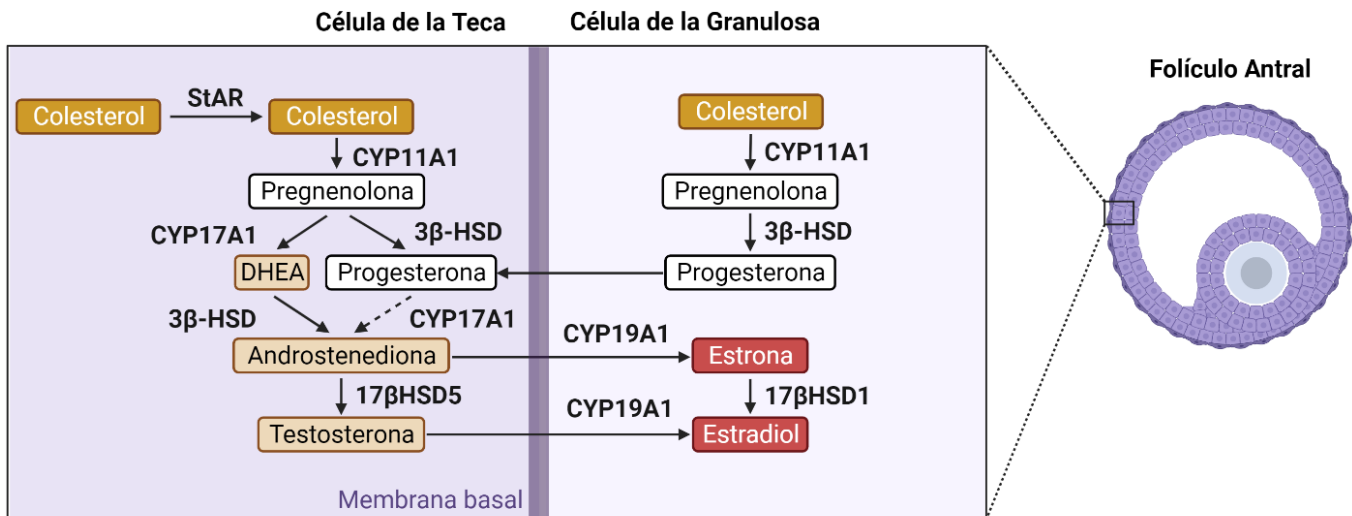


Figura 5. Síntesis de esteroides sexuales en hembras. Elaborado en BioRender por Natalia Martínez García de múltiples fuentes (Louw-du Toit *et al.*, 2017; Jamnongjit y Hammes, 2006; Wood y Strauss, 2002; Christenson y Strauss, 2000; Stocco, 2001; Miller y Auchus, 2011).

Ciclo estral en la rata

El ciclo estral es el ciclo reproductor de la rata, se define como el tiempo que transcurre entre un periodo de celo y el comienzo del siguiente. La duración promedio del ciclo estral es de 4 a 5 días, pero en algunos individuos se pueden observar ciclos ocasionales de 6 días (Long y Evans, 1922; Goldman y Cooper, 2007; Cora, Kooistra y Travlos, 2015). Muchos factores influyen en la duración del ciclo, incluidos la luz, la edad, la temperatura, el ruido, la nutrición, el estrés y las relaciones sociales (Goldman y Cooper, 2007; Cora, Kooistra y Travlos, 2015).

Las etapas del ciclo estral se identifican por la ausencia, presencia o proporción de cuatro tipos celulares básicos: neutrófilos, pequeñas células epiteliales nucleadas, células epiteliales nucleadas grandes y células epiteliales queratinizadas anucleadas. Convencionalmente, el ciclo se divide en las cuatro etapas: proestro, estro, metaestro y diestro; sin embargo, algunos investigadores utilizan una clasificación simple de proestro-estro-diestro, mientras que otros subdividen las cuatro etapas, registran las etapas de transición o cuantifican aproximadamente las poblaciones de células individuales (Goldman y Cooper, 2007; Cora, Kooistra y Travlos, 2015) (Figura 6).

I. Proestro

El proestro es una etapa corta, que dura un promedio de 14 h en rata. La característica predominante de esta etapa es la presencia de células epiteliales nucleadas, pequeñas, redondas, de apariencia y tamaño relativamente uniformes, estas células pueden teñirse profundamente basófilas. En un frotis vaginal, se pueden encontrar neutrófilos raros u ocasionales al comienzo del proestro, ya que el roedor habría pasado recientemente del diestro al proestro. También se puede observar un número relativamente bajo de células epiteliales grandes y de células anucleadas queratinizadas (Long y Evans, 1922; Cora, Kooistra y Travlos, 2015).

II. Estro

La duración del estro varía entre 24 y 48 h; se caracteriza por la presencia de células epiteliales queratinizadas predominantemente anucleadas. La primera y segunda mitad del estro, si bien consisten principalmente en células queratinizadas anucleadas, tienen claras diferencias en su apariencia. Ocasionalmente se pueden observar neutrófilos al final del estro, cuando el roedor está en transición al metaestro (Long y Evans, 1922; Cora, Kooistra y Travlos, 2015).

III. Metaestro

El metaestro es una etapa corta de 6 a 8 horas. El metaestro se caracteriza por una combinación de células epiteliales queratinizadas anucleadas y neutrófilos. En el metaestro temprano, los neutrófilos se intercalan con las células epiteliales y a veces, se encuentran muy juntos o agrupados alrededor de las células; las células epiteliales suelen predominar, pero pueden estar en igual proporción que los neutrófilos. A medida que avanza el metaestro, el número de neutrófilos aumenta mucho (superando en número a las células epiteliales hasta diez veces (Long y Evans, 1922; Cora, Kooistra y Travlos, 2015; Hubscher, Brooks y Johnson, 2005).

IV. Diestro

El diestro es la etapa más larga del ciclo estral con una duración promedio de 48 a 72 horas. Esta etapa se caracteriza por una disminución sustancial en el número de células epiteliales queratinizadas anucleadas, pero no necesariamente una ausencia de ellas, a medida que el animal sale del metaestro. La celularidad general es de moderada a baja con una combinación de neutrófilos, células epiteliales nucleadas pequeñas y grandes y un número bajo de células queratinizadas anucleadas. El número de neutrófilos puede variar, pero suele ser mayor en relación con las células epiteliales y, en ocasiones, los frotis son exclusivamente neutrófilos (Long y Evans, 1922; Cora, Kooistra y Travlos, 2015).

La duración de cada una de las cuatro etapas del ciclo estral varía entre 6 y 72 horas dependiendo de la etapa y del roedor individual, por lo tanto, algunas etapas cortas pueden “perdersse” al realizar un frotis vaginal, especialmente si las muestras se recolectan muy temprano o tarde en el día, por lo que la recolección de muestras se puede trasladar al final de la mañana o al comienzo de la tarde en un esfuerzo por minimizar la incidencia de etapas perdidas (Cora, Kooistra y Travlos, 2015).

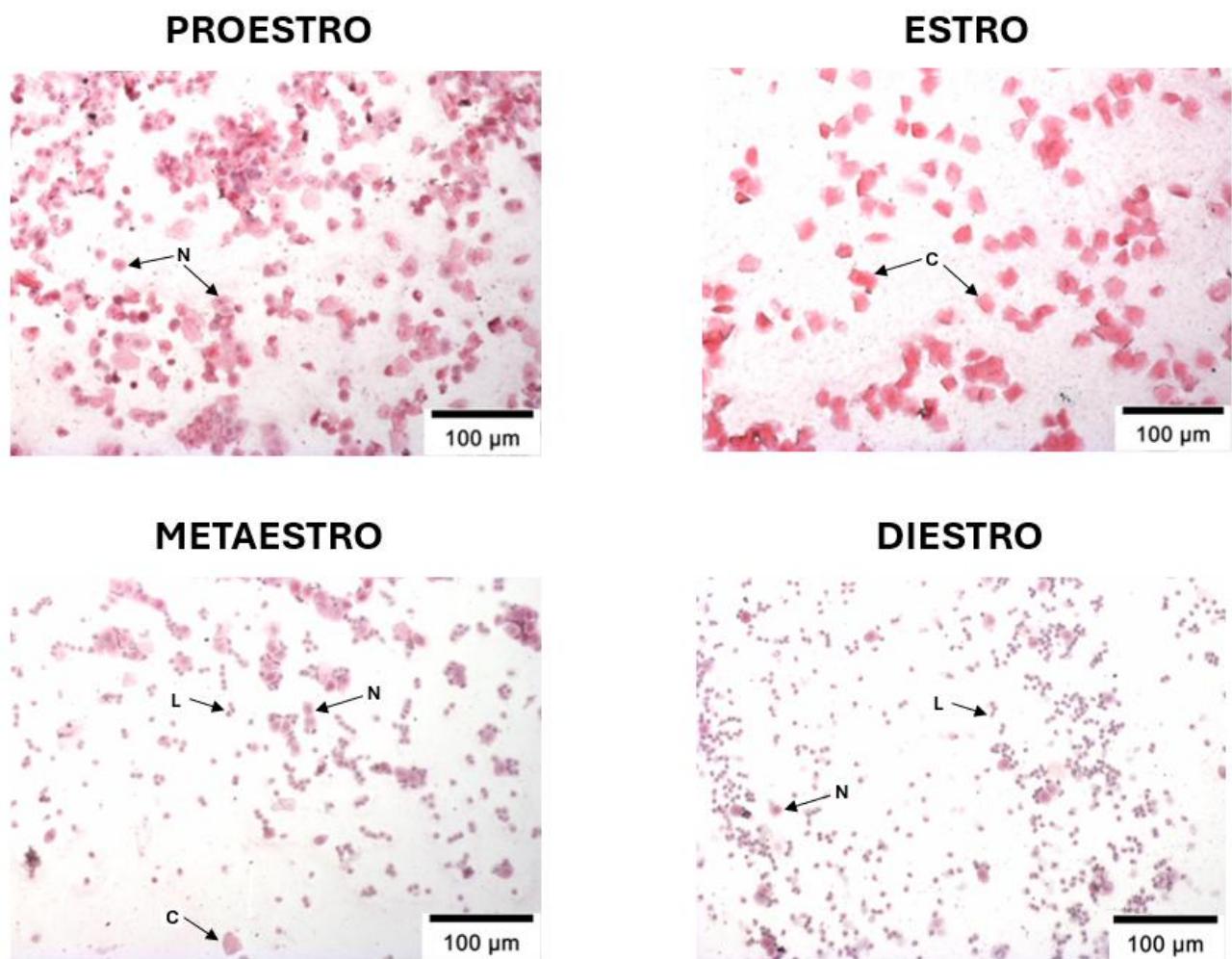


Figura 6. Imágenes representativas de las fases del ciclo estral (tinción con hematoxilina/eosina). El proestro se caracteriza por masas de células epiteliales nucleadas redondas. El estro se puede identificar por agregados de células cornificadas escamosas. El metaestro y el diestro expresan una combinación de tipos de células (leucocitos, células nucleadas y cornificadas), pero muestran menos células. N: Células nucleadas, C: Células cornificadas y L: Leucocitos Elaborado por Natalia Martínez García.

Útero

El útero desempeña un papel fundamental en una variedad de funciones en el organismo, que incluyen la gestación, el ciclo menstrual (en humanos), proporciona el entorno esencial para el desarrollo embrionario, la implantación y la formación de la placenta, además de apoyar el crecimiento fetal. En el caso de los roedores, el útero tiene una anatomía peculiar, ya que está compuesto por dos cuernos uterinos que convergen hacia la parte caudal, formando así el cuerpo uterino, que se extiende hasta el cuello uterino (Ameer *et al.*, 2022) (Figura 7).

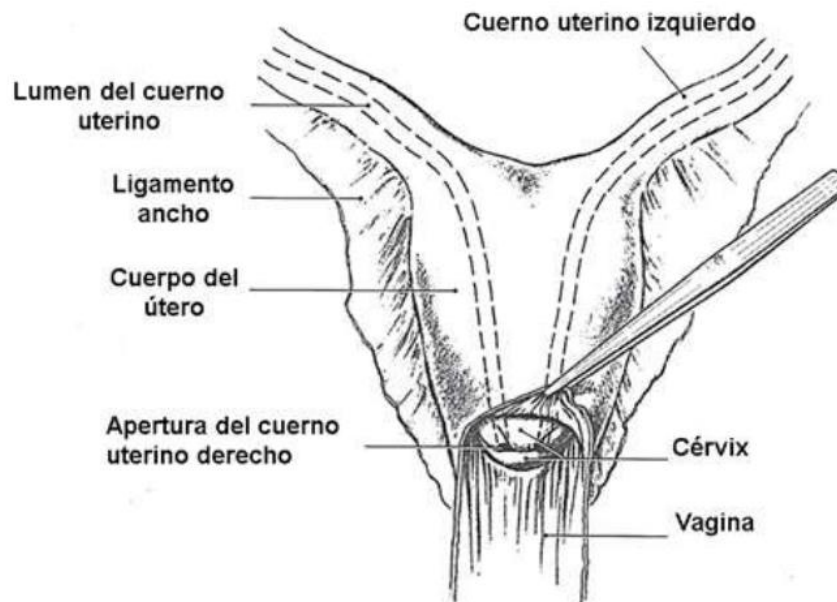


Figura 7. Anatomía del útero de rata. Tomado de De la Rosa, 2018.

Desde una perspectiva histológica, el útero de la rata, como en la mayoría de las especies de mamíferos, se compone de tres capas (Linares *et al.*, 2010; Ameer *et al.*, 2022) (Figura 8):

- a) **Endometrio o mucosa:** Esta capa consiste en el endometrio funcional (superficial) y el basal. La capa funcional es altamente receptiva a las hormonas reproductivas y se desprende total o parcialmente durante el ciclo estral. Está formada por un epitelio cilíndrico simple que reviste el lumen del útero. Debajo de este epitelio, separado por una membrana basal, se encuentra la zona basal, una capa delgada de tejido conjuntivo vascularizado que contiene menos células que la zona funcional y que se mantiene constante a lo largo del ciclo. También se pueden observar glándulas uterinas, que son invaginaciones tubulares del epitelio luminal.
- b) **Miometrio o capa muscular:** Principalmente compuesto por dos capas musculares, una interna con orientación circular y una externa con orientación longitudinal, entre las cuales se encuentra una capa de tejido conjuntivo-vascular que alberga grandes arterias, vasos linfáticos y venas.

- c) **Serosa o perimetrio:** Esta es la capa externa, constituida por tejido conjuntivo laxo y recubierta por la serosa peritoneal. Esta capa presenta una densa red de vasos linfáticos, sanguíneos y fibras nerviosas.

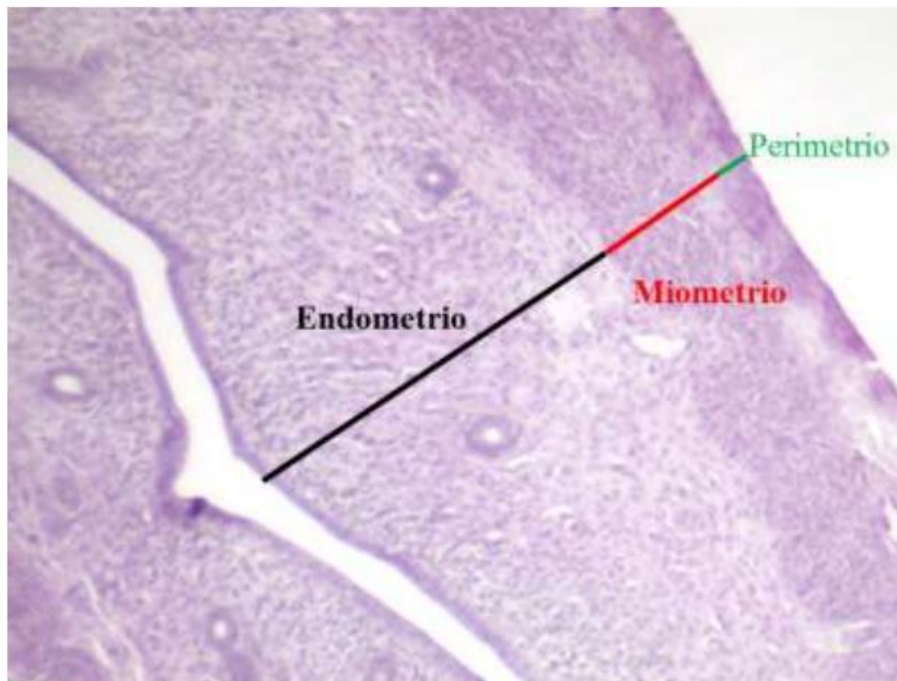


Figura 8. Corte histológico del útero de rata Wistar, en donde se observan las tres capas de tejido que lo conforman (tinción con hematoxilina/eosina). Tomado de De la Rosa, 2018.

La función principal del útero, en caso de producirse la fertilización de los ovocitos, es recibir al cigoto, el cual se implanta en el endometrio y obtiene nutrientes a través de los vasos sanguíneos desarrollados específicamente para este fin. A medida que el embrión crece y se desarrolla, el útero se expande para sostener la gestación (Shirasuna e Iwata, 2017). En una gestación exitosa, este órgano garantiza la protección y el mantenimiento del entorno gestacional, culminando con el nacimiento del producto (Gnanamanickam y Llewellyn-Smith, 2011).

La función principal del útero, en caso de que ocurra la fertilización de los ovocitos, es recibir el óvulo fertilizado, que posteriormente se implanta en el endometrio y obtiene nutrientes de los vasos sanguíneos desarrollados específicamente para este propósito. Conforme el embrión crece y se desarrolla, el útero se expande para albergar el embarazo (Shirasuna e Iwata, 2017). En el caso de un embarazo exitoso, el útero cumple la función de albergar, mantener y posteriormente dar a luz al embrión (Gnanamanickam y Llewellyn-Smith, 2011).

Durante las diferentes etapas del ciclo estral, los distintos compartimentos que conforman el útero de la rata experimentan cambios morfológicos y funcionales que dependen de la acción de las hormonas ováricas en cada momento y como se ha mencionado, las concentraciones de hormonas ováricas no permanecen constantes durante todo el ciclo estral. Por ejemplo, durante el proestro, el útero se encuentra distendido debido a la acumulación de líquido. En el estro, la distensión uterina es máxima, y comienza la degeneración vacuolar del epitelio uterino. En el metaestro, la degeneración vacuolar en

el útero alcanza su punto máximo. Finalmente, en el diestro, el epitelio uterino se regenera (De la Cruz y Pásaro, 1998; Gartner, 2008).

Obesidad y alteraciones en el eje reproductivo

La obesidad es una condición fisiológica que se caracteriza por una acumulación anormal y excesiva de grasa en el cuerpo, lo que puede dar lugar a problemas de salud adversos, especialmente afectando al corazón, al hígado, a las articulaciones y al sistema reproductivo. Se trata de una enfermedad crónica y multifactorial; dentro de las causas de la obesidad se incluyen factores genéticos, epigenéticos, ambientales, fisiológicos y culturales que interactúan en la mayoría de los casos. Desde el punto de vista nutricional, la obesidad es originada por un desequilibrio entre la cantidad de calorías ingeridas y el gasto energético, lo que resulta en un aumento del tejido adiposo y como consecuencia un incremento del peso corporal. La obesidad se ha convertido en una epidemia, lo que significa que afecta a un gran número de personas y tiene un impacto significativo en la salud pública en diferentes países (Ahmed y Konje, 2023; Quintero *et al.*, 2020; Moreno, 2012).

Recientemente, la Comisión de Obesidad Clínica de *The Lancet* propuso una definición más precisa de esta condición, diferenciando entre obesidad preclínica y obesidad clínica. La obesidad clínica se entiende como una enfermedad sistémica con disfunción comprobable en tejidos, órganos o en la capacidad funcional del individuo, atribuible al exceso de grasa corporal. En cambio, la obesidad preclínica se refiere al exceso de adiposidad sin alteraciones funcionales aparentes, pero con un riesgo elevado de desarrollar complicaciones metabólicas. La Comisión también recomienda no utilizar el índice de masa corporal (IMC) como única herramienta diagnóstica individual, sino complementarlo con mediciones antropométricas o directas de la grasa corporal. Esta nueva visión permite orientar el diagnóstico, tratamiento y política pública hacia un enfoque más justo, individualizado y basado en evidencia (Blüher, 2024).

Las repercusiones de la obesidad en la salud reproductiva femenina se presentan en diferentes ámbitos, podría relacionarse con trastornos menstruales, síndrome de ovario poliquístico (SOP), ovulación infrecuente o inexistente, además de ocasionar alteraciones en el desarrollo folicular afectando la fertilidad, entre otras (Gao *et al.*, 2021).

El tejido adiposo no solo cumple una función de soporte estructural, sino que también desempeña un papel esencial en la regulación metabólica, principalmente a través de la acción de los adipocitos. Esta función endocrina del tejido adiposo ha sido ampliamente documentada. Dentro de la diversidad de tipos de tejido adiposo, el tejido adiposo blanco (TAB) adquiere una destacada importancia debido a su capacidad para sintetizar ácidos grasos y su actividad endocrina. El TAB se distribuye ampliamente en el organismo, tanto en las zonas viscerales como subcutáneas (Silvestris *et al.*, 2018).

En el contexto de la obesidad, la expansión del TAB se debe principalmente a la hiperplasia, es decir, un aumento en el número de adipocitos. Los adipocitos que experimentan hipertrofia se asocian con una mayor producción de adipocinas de naturaleza proinflamatoria (Frigolet y Gutiérrez-Aguilar, 2020). Cabe destacar que las adipocinas son proteínas secretadas principalmente por el tejido adiposo, aunque también pueden provenir de otros tejidos. Sin embargo, la adiposidad puede inducir cambios que perturban la regulación de ciertas adipocinas, como la leptina, la adiponectina, la resistina y la visfatina (Silvestris *et al.*, 2018).

Los procesos reproductivos, como la menstruación, la ovulación, la implantación y el embarazo, están influenciados por los adipocitos, que a su vez secretan adipocinas (Gao *et al.*, 2021). La activación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada depende de la presencia de niveles apropiados de algunas adipocinas. Además, su participación es fundamental para la correcta activación y secreción de gonadotropinas (Nieuwenhuis *et al.*, 2020).

La leptina es una proteína de señalización celular que consta de 167 aminoácidos codificados por el gen *LEP* (también denominado *ob*) y secretada principalmente por los adipocitos blancos (Childs *et al.*, 2021). Los niveles de leptina experimentan un aumento después de la ingesta de alimentos, y la cantidad liberada está estrechamente vinculada al tejido adiposo. Por lo tanto, en situaciones de sobrealimentación y obesidad, se observa un incremento en la secreción de leptina. La hiperleptinemia, es decir, altos niveles de leptina en la sangre, tiene la capacidad de inhibir los efectos en las células diana y la falta de sus funciones conduce a la resistencia a la leptina (Obradovic *et al.*, 2021; Quintanar y Salinas, 2022). Esto puede dar lugar a alteraciones en la señalización de las neuronas hipotalámicas, ya que la leptina también participa en la secreción de GnRH y LH (Goldsammler *et al.*, 2018). Las mujeres con hiperleptinemia y relaciones leptina-IMC elevadas tienen tasas más bajas de embarazo con técnicas de fertilización *in vitro* (Brannian *et al.*, 2001).

La adiponectina es la adipocina más abundante en el plasma humano y está compuesta por 244 aminoácidos. En el hipotálamo, parece desempeñar un papel en el inicio de la pubertad al regular la expresión del gen de la kisspeptina, lo que favorece la secreción de GnRH (Merhi *et al.*, 2019). Sin embargo, la obesidad puede inducir disfunciones metabólicas que provocan cambios en los niveles de adiponectina (Gelsomino *et al.*, 2019), lo que resulta en una disminución de la expresión génica y plasmática de esta proteína (Silvestris *et al.*, 2018).

La disfunción reproductiva también puede ser causada por cambios en la secreción de factores que intervienen en la foliculogénesis. La reducción de la adiponectina en el líquido folicular se relaciona con una disminución en los niveles séricos de AMH (Merhi *et al.*, 2019). Además, se observa un menor número de ovocitos, un aumento en la atresia folicular, la reducción de los folículos antrales, una disminución en FSH y el E2, así como un aumento en LH (Goldsammler *et al.*, 2018 y Merhi *et al.*, 2019).

En ambos casos, la disminución de los niveles de adiponectina causada por las disfunciones relacionadas con la obesidad afecta la secreción y probablemente la activación de las vías reproductivas ya sea al influir en señales tempranas durante la pubertad o al reducir la reserva ovárica debido a la disminución de la expresión de la AMH (Munguía, Montaña y Hernández, 2023).

Finalmente, otras adipocinas de interés son la resistina y la visfatina. Varios estudios han asociado el aumento en los niveles plasmáticos de ambas proteínas con individuos obesos (Bongrani *et al.*, 2019; Frigolet y Gutiérrez-Aguilar, 2020; Silvestris *et al.*, 2018). Aunque los mecanismos subyacentes no se comprenden completamente, la expresión de resistina y visfatina en estructuras reproductivas sugiere un posible papel regulador. El incremento de estas proteínas se ha relacionado con trastornos reproductivos, como el SOP, entre otras alteraciones (Silvestris *et al.*, 2018).

En seres humanos, tanto la resistina como la visfatina se expresan a nivel folicular, incluyendo en el ovocito, las células cumulares, las células de la granulosa y las células de la teca (Bongrani *et al.*, 2019; Messini *et al.*, 2019). Un estudio *in vitro* sugiere que la resistina podría inhibir la secreción de estradiol

y progesterona en el cuerpo lúteo (Messini *et al.*, 2019). Esto sugiere que la resistina podría desempeñar un papel en la producción de hormonas esenciales para la maduración de los folículos y los eventos de fertilización (Orisaka *et al.*, 2021). En el caso de la visfatina, el aumento en los niveles plasmáticos en mujeres obesas se ha correlacionado con la disminución de E2, LH y de la SHBG (Alnowihi *et al.*, 2020). Un análisis *in vitro* ha destacado el aumento de esta proteína en el líquido folicular y la disminución del número de ovocitos, folículos y AMH en la sangre (Bongrani *et al.*, 2019).

Las mujeres obesas a menudo tienen niveles circulantes más altos de insulina, suelen presentar resistencia a la insulina e hiperinsulinemia y como consecuencia se dificulta la producción hepática de SHBG dando como resultado hiperandrogenemia (Rachoñ y Teede, 2010). Además, dichos andrógenos se aromatizan a estrógenos a altas tasas en la periferia debido al exceso de tejido adiposo, ya que el tejido adiposo expresa numerosas enzimas capaces de modificar esteroides, por ejemplo, la aromatasas que cataliza la conversión de testosterona a estradiol y de androstenediona a estrona (Jungheim y Moley, 2010; Broughton y Moley, 2017).

Los niveles más bajos de SHBG y el aumento de la aromatización periférica de andrógenos a estrógenos en mujeres obesas también dan como resultado niveles más altos de estrógeno circulante libre, lo que puede conducir a una mayor retroalimentación negativa en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada. Este aumento de la retroalimentación negativa afecta la secreción de gonadotropina necesaria para el reclutamiento folicular ovárico adecuado y la ovulación (Jungheim y Moley, 2010; Broughton y Moley, 2017).

Otro punto por considerar es el exceso de ácidos grasos libres, que puede tener un efecto tóxico en los tejidos reproductivos, provocando daño celular y estado inflamatorio crónico de bajo grado. Los niveles alterados de adipocinas, como la leptina, pueden afectar la esteroidogénesis y directamente al embrión en desarrollo. El endometrio también es susceptible, con evidencia de alteración de la decidualización del estroma en mujeres obesas. Esto podría explicar la disminución de la fertilidad debida a una receptividad alterada, lo cual a su vez podría dar lugar a anomalías placentarias que se manifiestan por tasas más altas de aborto espontáneo, mortinatos y preeclampsia en la población obesa (Broughton y Moley, 2017).

Existe evidencia en modelos animales, que demuestran el efecto negativo de la obesidad sobre la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada (Figura 9), por ejemplo, Tortoriello *et al.* (2004) demostraron que los ratones con obesidad inducida por dieta tenían una disminución del 60% en las tasas de embarazo natural, pero que este defecto podría solucionarse mediante la administración de gonadotropinas exógenas, lo que indica una alteración del mecanismo central en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada.

En otro estudio, realizado por los mismos autores, se diseñó un modelo de ratón con mutaciones genéticas (*ob/ob* y *Ay/a*) que conducen a un fenotipo obeso e infértil independientemente de la dieta y descubrieron que los ratones que eran resistentes para desarrollar este fenotipo tenían niveles más altos de receptores de leptina en el hipotálamo (Tortoriello, McMinn y Chua, 2007).

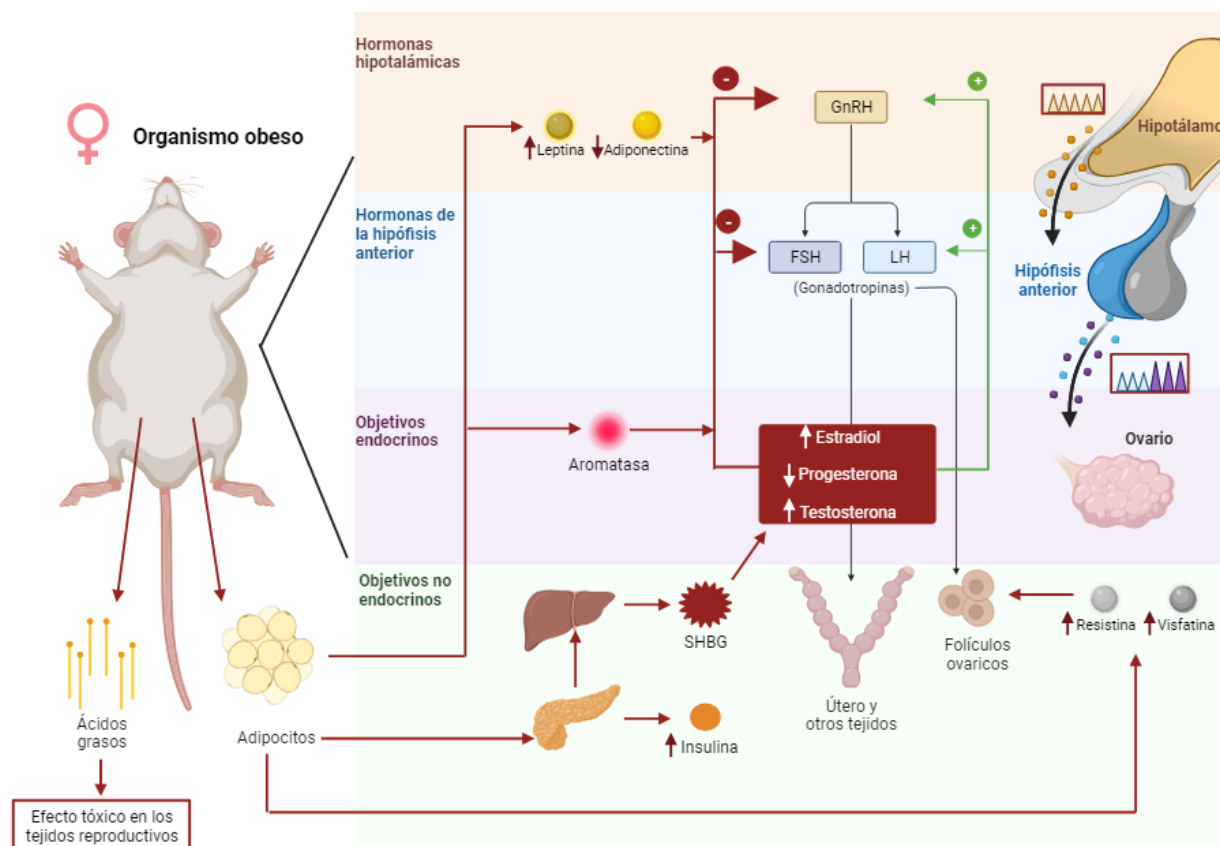


Figura 9. Esquematización del eje hipotálamo-hipófisis-gónada en organismos con obesidad. Elaborado por Natalia Martínez García de múltiples fuentes (Brannian *et al.*, 2001; Rachoñ y Teede, 2010; Jungheim y Moley, 2010; Broughton y Moley, 2017; De la Riva, 2018; Pacheco, 2010; Munguía, Montañó y Hernández, 2023).

Modelos animales utilizados en el estudio de obesidad

Debido a la gran similitud y homología entre el genoma de murinos y humanos, los modelos animales han sido utilizados en el estudio de diferentes condiciones que pueden tener efectos de forma similar a los seres humanos. De los modelos a usar es el de la obesidad en animales la cual puede ser inducida mediante manipulación genética, dietética o inducción de alteraciones neuroendocrinas. Los métodos utilizados frecuentemente para inducir obesidad en ratas son mediante la administración de fármacos como el glutamato monosódico, alimentación con dietas hipercalóricas, manipulación genética o inducida por manipulación de camadas (Suárez *et al.*, 2013; Martínez Pérez, 2022) (Tabla 1).

Tabla 1. Cepas de ratas que se han utilizado como modelos de obesidad inducida (Martinez Pérez, 2022; Aleixandre y Miguel, 2008).

Cepa de rata	Modelo de obesidad	Descripción	Referencia
Wistar, Sprague Dawley y Long Evans	Inducida por dieta	Obesidad provocada por ingesta excesiva de calorías	Akamine <i>et al.</i> , 2010; Ambrosetti <i>et al.</i> , 2016 y Ressler <i>et al.</i> , 2015.
JCR:LA-cp/cp, Sprague-Dawley Crl:CD (SD) IGS BR y Zucker <i>fa/fa</i>	Genética	Animales con mutaciones específicas, la obesidad y adiposidad frecuentemente son graves en este modelo de animales, dando lugar a diferentes fenotipos	Leblanc <i>et al.</i> , 2014; Morita <i>et al.</i> , 2008 y Aleixandre y Miguel, 2008.
Wistar y Sprague Dawley	Inducida por fármaco	La obesidad se presenta como resultado de la administración de fármacos como: glutamato monosódico, cloruro de tributilestaño, leptina	Gaspar <i>et al.</i> , 2016; Duggal <i>et al.</i> , 2000.
Wistar	Inducida por manipulación de camadas	Establecimiento de camadas pequeñas (3-4 crías) en donde las crías tienen mayor acceso al alimento brindado por sus madres en comparación con las crías de camadas grandes	Sominsky <i>et al.</i> , 2016.

Las ratas Zucker obesas (*fa/fa*), tanto hembras como machos, suelen ser el modelo de rata más utilizado y mejor conocido de obesidad inducida por modificación genética. Los animales homocigotos para el alelo *fa*, más conocidos como ratas Zucker obesas, presentan obesidad entre la tercera y la quinta semana de vida y finalmente cuando alcanzan las 14 semanas de vida, un 40% de su peso corporal tiene composición lipídica. Las ratas Zucker obesas presentan una mutación en el receptor de leptina, que es la base molecular de su característico fenotipo (Aleixandre y Miguel, 2008).

La obesidad que caracteriza a las ratas Zucker obesas se acompaña de resistencia a la insulina, dislipemia, ligera intolerancia a la glucosa e hiperinsulinemia (detectable a las 3 semanas de su nacimiento y persiste toda la vida de los animales) (Stern *et al.*, 1972; Muller y Cleary, 1988).

Tradicionalmente, se han utilizado las ratas Zucker delgadas (*fa/+*), como grupo control en investigaciones fisiológicas, metabólicas o endocrinas, ha sido una práctica frecuente. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que estas ratas presentan alteraciones fisiológicas y bioquímicas que las hacen inadecuadas como controles verdaderamente normopeso o intactos, especialmente cuando se comparan con sus contrapartes obesas (*fa/fa*) (Cleary *et al.*, 1999).

Desde el punto de vista genético, las ratas Zucker delgadas son heterocigotas para la mutación en el gen LEPR, que codifica el receptor de leptina. Aunque estas ratas no desarrollan obesidad evidente, sí presentan alteraciones metabólicas sutiles (Cleary *et al.*, 1999) demostraron que las ratas *fa/+* tienen un fenotipo intermedio entre las ratas Zucker obesas y las homocigotas normales (+/+), con acumulación temprana de lípidos, hiperinsulinemia basal y una mayor actividad de enzimas lipogénicas. Estas diferencias son críticas al evaluar tratamientos o condiciones fisiológicas en las que el metabolismo lipídico puede interferir con los resultados experimentales (Cleary *et al.*, 1999).

Griffen *et al.* (2001) reportaron que ciertas disfunciones en la expresión génica de las células β pancreáticas se manifiestan en ratas Zucker, incluso en ausencia de obesidad. Esto indica que el fondo genético de la cepa Zucker, más allá de la mutación *fa/fa*, contiene otros defectos que alteran la regulación glucémica, lo cual puede sesgar significativamente los resultados cuando se analiza el eje metabólico (Griffen *et al.*, 2001).

Morris y Zemel (2003) aportaron evidencia de que las ratas Zucker delgadas son altamente sensibles a la composición de la dieta, particularmente a los carbohidratos. Observaron que las ratas *fa/+* alimentadas con dietas ricas en glucosa presentaban una lipogénesis hepática exacerbada, asociada a mayor expresión de SREBP-1c y otras enzimas relacionadas con la síntesis de ácidos grasos, aun sin obesidad aparente.

Finalmente, Imai *et al.* (2013) documentaron que las ratas Zucker delgadas (*fa/+*) son significativamente más susceptibles al desarrollo de cáncer mamario inducido químicamente por 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA), en comparación con ratas homocigotas normales (+/+). Esta mayor susceptibilidad se correlacionó con niveles elevados de leptina sérica, incluso desde las 7 semanas de edad y con una mayor agresividad tumoral en los primeros estadios de la enfermedad. Los tumores más agresivos en las ratas *fa/+* mostraron una activación incrementada de la vía de las MAP quinasas ERK1/2, lo que sugiere que la hiperleptinemia subclínica en ausencia de obesidad ya es suficiente para alterar procesos hormonales y celulares clave, como la proliferación tumoral. Este hallazgo refuerza que el perfil hormonal y molecular de estas ratas no corresponde al de un animal fisiológicamente sano (Imai *et al.*, 2013).

En conjunto, estos hallazgos muestran que el uso de la cepa Zucker *fa/+* como grupo control normopeso resulta inadecuado, ya que introduce un sesgo metodológico que puede subestimar o sobrestimar los efectos del tratamiento en estudio. En su lugar, se recomienda utilizar ratas Zucker +/+ (homocigotas normales) que no portan la mutación *fa* y comparten el mismo fondo genético, o cepas como Sprague-Dawley, Wistar o Long-Evans, ampliamente reconocidas por su estabilidad endocrina, metabólica y reproductiva y por carecer de predisposiciones genéticas a trastornos hormonales o metabólicos (National Research Council, 2011).

GnRH y función de sus agonistas

La hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) constituye un regulador central del eje reproductivo. Actualmente está bien aceptado que, además de la forma clásica de GnRH (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂), existen otras isoformas del decapeptido en los vertebrados. En todas estas isoformas se conservan las secuencias de aminoácidos tanto N-terminales (pGlu-His-Trp-Ser) como C-terminales (Pro-Gly-NH₂) y la mayoría de las especies de vertebrados expresan más de una forma de GnRH. En particular, se ha identificado una segunda forma de GnRH en la mayoría de los vertebrados,

incluidos los humanos. Esta forma se conoce comúnmente como "GnRH-II de pollo", o simplemente GnRH-II, y su estructura se conserva de manera única desde los peces hasta los mamíferos (Maggi *et al.*, 2016).

La existencia de dos sistemas de GnRH en varias especies de mamíferos sugiere que tanto la GnRH I (Figura 10) como la GnRH-II pueden desempeñar funciones importantes como reguladores endocrinos /autocrinos/ paracrinos de las funciones reproductivas. La GnRH-I varía según las clases de 31 vertebrados, se localiza principalmente en el área preóptica y es responsable de la regulación central de la secreción de gonadotropinas por parte de la hipófisis, mientras que la GnRH-II se diferencia de GnRH-I en tres residuos de aminoácidos en las posiciones 5, 7 y 8 del amino terminal se localiza en áreas cerebrales extrahipotalámicas, principalmente el mesencéfalo, endometrio, ovario y placenta (así como en tumores derivados de estos tres últimos tejidos) y se ha asociado con una gama de funciones vinculadas a la reproducción (Maggi *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2009; Berger *et al.*, 1991).

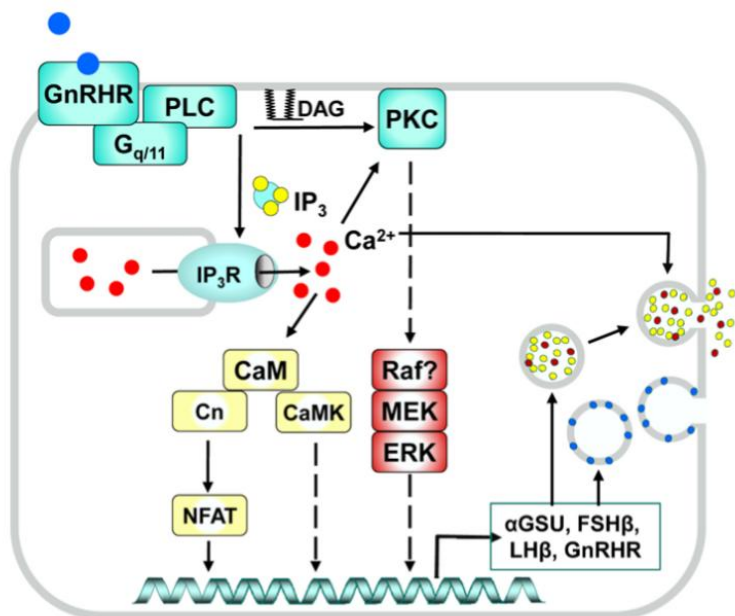


Figura 10. Red de señalización GnRHR simplificada. GnRH-I activa GnRHR provocando una activación de la fosfolipasa C (PLC) mediada por Gq/11. Esto genera IP3 que impulsa la movilización mediada por el receptor IP3 desde los almacenes intracelulares, y diacilglicerol (DAG) que (con Ca²⁺) activa las isoenzimas PKC convencionales. La GnRH-I aumenta el Ca²⁺ citoplasmático y esto impulsa la secreción exocitótica regulada de LH y FSH desde el interior de las vesículas secretoras. El Ca²⁺ también activa la calmodulina (CaM), que activa las proteínas quinasas dependientes de CaM (CaMK) y la fosfatasa calcineurina (Cn), que activa el Ca²⁺-factor de transcripción dependiente NFAT (factor nuclear de células T activadas). La GnRH-I también activa las cascadas MAPK, incluida la activación (en gran medida mediada por PKC) de la cascada Raf/MEK/ERK que se muestra. Los factores de transcripción activados por NFAT y ERK (entre otros) actúan en combinación para controlar la expresión genética. Los genes diana de GnRH incluyen las subunidades de gonadotropina; La GnRH-I regula de forma aguda la tasa de fusión de las vesículas con la membrana plasmática y regula de forma crónica el contenido de gonadotropinas de estas vesículas (Tomado de Pratap *et al.*, 2017).

Las acciones de la GnRH y sus análogos están mediadas por receptores de alta afinidad para la GnRH (GnRHR) que se encuentran en las membranas de los gonadotrofos hipofisarios (Clayton y Catt, 1981). El GnRHR de mamíferos es un receptor acoplado a proteína G con siete sitios transmembranales y 328 aminoácidos de longitud (Millar *et al.*, 2004). Además de su expresión en los gonadotropos hipofisarios, este receptor se expresa en otros tejidos humanos, como la placenta, el útero, el ovario, la glándula prostática y la mama (Cheng y Leung, 2000; Harrison *et al.*, 2004; Wilson *et al.*, 2006).

GnRHR tipo I de humanos, ratas, ratones, cerdos, ovejas y caballos comparten >80% de homología en la secuencia de aminoácidos (Millar *et al.*, 2004; Morgan y Millar, 2004). Hay dos tipos de agonistas superactivos de la hormona liberadora de gonadotropina, GnRHa-I y GnRHa II, cuya actividad hormonal se entiende que se debe a su mayor afinidad por el receptor y su mayor estabilidad proteolítica en comparación con la secuencia nativa de GnRH. Además de sus efectos sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, los agonistas de GnRH-I tienen el potencial de modular la función ovárica mediante un efecto directo sobre el ovario. Numerosos estudios han documentado un sistema ovárico funcional de GnRH-I y receptor de GnRH en ovarios de ratas y humanos (Hsueh y Schaeffer, 1985; Uemura *et al.*, 1994). Un ejemplo claro de GnRHa-I es el acetato de leuprolide (Scotti *et al.*, 2011).

Tabla 2. Agonistas de GnRH más utilizados en tratamientos para inducción de la ovulación (Bonilla, 2018; Bettahar y Pinton, 2019).

Molécula	Dosis	Vía de administración	Kd
Triptorelina	0.2 mL	Subcutánea	~0.2–0.3 nM
Acetato de Leuprolide	0.2 mL (1 mg)	Subcutánea	~0.2 nM
Nafarelina	0.2 mg/dosis	Nasal	~0.03–0.06 nM

Nota: Los valores de Kd se determinaron en células CHO-hGnRH (ovario de hámster chino transfectadas con hGnRH-R, ensayos de radioligando) y en células HEK293 Tag-lite GnRH (HEK293 humanas con hGnRH-R fusionado a terbio, ensayos TR-FRET) (Nederpelt *et al.*, 2016).

ANTECEDENTES

Alteraciones reproductivas en la rata Zucker obesa

Las hembras Zucker obesas presentan alteraciones reproductivas bien documentadas, entre ellas ciclos estrales prolongados (7 a 8 días de duración), aumento de la fase de diestro y escaso desarrollo folicular en la mayoría de los casos. Además, suelen presentar concentraciones plasmáticas de estradiol disminuidas y de progesterona incrementadas (Marín Bivens y Olster, 1997; Keen-Rhinehart y Kalra, 2004).

Algunos estudios han demostrado que en la rata Zucker hembra adulta se observa secreción pulsátil anormal de LH (Todd, Ladyman y Grattan, 2003) y durante el ciclo estral, el pico de LH en la tarde del proestro está reducido. Asimismo, se ha descrito que estas ratas también presentan a lo largo del ciclo modificaciones de las concentraciones plasmáticas de FSH, prolactina y progesterona, Honnman *et al.*, (2010) reportaron que las concentraciones máximas de dichas hormonas en la etapa de proestro se encuentran reducidas en ratas Zucker obesas; además dichos autores sugieren que la reducción en la esteroidogénesis ovárica en las ratas Zucker obesas está relacionada con los cambios en la morfología ovárica observados en dichos organismos, incluidas las reducciones en el número de folículos sanos y en la baja producción de adiponectina ovárica; alternativamente, la baja esteroidogénesis ovárica puede contribuir a la atresia folicular acelerada que se observa en ratas Zucker obesas. La ausencia de secreción pulsátil de LH en la rata Zucker se podría explicar por la falta de estímulo de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) que, a su vez, se vería afectada por la ausencia de la acción estimuladora de la leptina, lo cual, por falta del receptor a la hormona, es una característica representativa de esta cepa de ratas (De Lugo y Jurado, 2006).

Algunos estudios sostenían que las hembras Zucker obesas tienen un útero poco desarrollado y son infértiles (Aleixandre y Miguel, 2008). No obstante, el estudio del útero de la rata Zucker obesa ha mostrado datos contradictorios. En un estudio realizado por Chelich y Edmonds (1986) se describieron úteros normales en estos animales. Además, un estudio realizado por los mismos autores en 1981, demostró que la rata Zucker hembra obesa ya no puede considerarse uniformemente estéril, debido a que, a pesar de mostrar un embarazo infrecuente, las hembras obesas jóvenes de esta cepa han logrado quedar preñadas; sin embargo, se sugiere que las bajas tasas de preñez y pseudopreñez de las hembras Zucker obesas se deben a la baja frecuencia de intromisión de los machos. De igual forma, las diferencias en sollicitación y lordosis contribuyen, pero no pueden explicar totalmente el bajo cociente de intromisión, por lo que la obesidad extrema de las hembras podría crear un problema mecánico que interfiere con la mecánica de la cópula (Chelich y Edmonds, 1981).

En términos generales, la obesidad en la rata Zucker hembra repercute de manera integral en la fisiología reproductiva, al modificar tanto el ciclo estral y la secreción hormonal como la dinámica folicular. Este escenario ha abierto la necesidad de evaluar alternativas farmacológicas encaminadas a recuperar la función ovárica y favorecer la ovulación en este modelo. Cabe recalcar que el interés en mejorar la fertilidad en la rata Zucker no se limita a resolver su disfunción per se, sino a utilizar este organismo como un referente experimental que permita aproximarse a los posibles efectos y respuestas terapéuticas en humanos.

Uso de leuprolide para estimulación de la ovulación

Los agonistas de la GnRH se han desarrollado como una estrategia para regular la función reproductiva en tratamientos de reproducción asistida (Schally, Coy y Arimura, 1980). El acetato de leuprolide (LEU) es un análogo sintético del decapeptido GnRH, cuyo nombre químico es acetato de 5-oxo- L -proliil- L -histidil- L -triptofil- L -seril- L -tirosil- D -leucil- L -leucil- L -arginilN -etil- L -prolinamida, este agonista de GnRH es más potente que el péptido GnRH natural, considerándose como un “superagonista” debido a su mayor afinidad (Kd: ~0.2 nM) por los receptores GnRH y a su vida media más larga (~3 h frente a 3 - 4 min en comparación con la GnRH endógena) (Conn y Crowley, 1994; Sennello *et al.*, 1986; Nederpelt *et al.*, 2016; Periti, Mazzei y Mini, 2002).

Por ser un decapeptido que se degradaría en el aparato digestivo, los análogos de GnRH no se usan por vía oral, si no que se los administra por vía intramuscular, intranasal o subcutánea (Ruhlmann *et al.*, 1995). La biodisponibilidad del LEU es similar tanto para la vía de administración intravenosa como subcutánea (De la Riva, 2018).

Farmacocinética

El LEU se ha implementado para el tratamiento de diversas condiciones médicas, como el cáncer de próstata, la endometriosis, la pubertad precoz y tratamientos en reproducción asistida. Generalmente, se administra como una inyección subcutánea o intramuscular de liberación prolongada (Takeda Pharmaceuticals America, 2021).

Después de la administración, el fármaco se absorbe gradualmente y se distribuye por el cuerpo. Su absorción es rápida y completa por vía subcutánea, con una biodisponibilidad del 94% (IQB, 2014). Una vez absorbido, se distribuye ampliamente, alcanzando concentraciones elevadas en el hígado, la glándula pineal, los riñones y los tejidos de la pituitaria (Boletín Oficial de la República Argentina, 2015).

Es importante destacar que los efectos de la administración de LEU son completamente reversibles al interrumpir el tratamiento (Wilson *et al.*, 2007; Shivers *et al.*, 1983). La excreción del fármaco y sus metabolitos es principalmente renal, con menos del 5% de la dosis recuperada en la orina después de la administración de LEU en suspensión depot (CECMED, 2015).

Farmacodinamia

Estudios realizados tanto en animales como en seres humanos han evidenciado que LEU inicialmente induce un aumento brusco en la secreción de LH y FSH por parte de la hipófisis, lo que conduce a un incremento de los niveles de esteroides sexuales en el suero a los 3 días de iniciar el tratamiento (IQB, 2014). Produce una elevación inicial de los niveles circulantes de LH y de FSH, seguida de una reducción de estos niveles, así como de los niveles de esteroides sexuales (Boletín Oficial de la República Argentina, 2015). En hombres, la testosterona se reduce a niveles prepuberales, mientras que, en mujeres premenopáusicas, los estrógenos se reducen a niveles posmenopáusicos (CECMED, 2015). Este efecto es reversible tras la interrupción del tratamiento (Wilson *et al.*, 2007; Shivers *et al.*, 1983).

No obstante, en el caso de una administración crónica y a dosis elevadas de LEU, se produce una inhibición del eje hipotálamo-hipófisis-gónada debido a la "regulación a la baja" de los receptores de GnRH en la hipófisis, a la desensibilización de los gonadotropos hipofisarios y a la supresión de los

niveles circulantes de LH, FSH y esteroides sexuales en un período de 2 a 4 semanas (Schally *et al.*, 2001).

Tabla 3. Ejemplos de algunos estudios implementando diferentes dosis de LEU.

Autor	Modelo de estudio	Dosis LEU	Tiempo de administración	Efecto de LEU
Serrano-Mujica <i>et al.</i> , 2017	Rata Wistar androgenizadas después nacimiento (5° día de vida)	Dosis única de 0,40 mg i.m.	Al segundo día de vida (pre androgenización)	Inhibidor
Taylor <i>et al.</i> , 2010	Ratas Sprague-Dawley de 8 semanas de edad ooforectomizadas	2 dosis de 1,7 µg/kg diluida en solución salina, con 12 h de diferencia	Un día	Estimulante
Scotti, 2011	Ratas Sprague-Dawley con hiperestimulación ovárica de 21 a 23 días de edad	100 g/kg	Diariamente durante 5 días	Inhibidor
Torres <i>et al.</i> , 2005	Ratas hembra Wistar de 12 y 14 semanas de edad	100 µg, 0,1 ml	A las 9 am del primer diestro durante 6 días	Inhibidor
Knudtson <i>et al.</i> , 2017	Ratas Sprague Dawley de 6 semanas de edad	2,5 µg/rata s.c.	Diariamente, durante 21 días	Estimulante
Patel y Shah, 2018	Ratas Sprague-Dawley de 105 días de edad	2,5 µg/rata, s.c.	Diariamente durante 21 días	Estimulante
Guarraci <i>et al.</i> , 2023	Ratas Long- Evans de 25 días postnatales de edad	50 µg/kg s.c.	Diariamente durante 25 días	Inhibidor
Ozcelik <i>et al.</i> , 2010	Ratas Wistar-Albino de cuatro meses de edad	2,5 µg/rata s.c.	Diariamente, durante 35 días	Estimulante

Nota: Es observable que dosis altas y agudas (1–5 días) suelen inhibir el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, mientras que dosis bajas, ya sean agudas o crónicas (1–35 días), pueden inducir un efecto estimulante. (Knudtson *et al.*, 2017; Ozcelik *et al.*, 2010; Taylor *et al.*, 2010; Patel y Shah, 2018; Torres *et al.*, 2005; Scotti *et al.*, 2011; Serrano-Mujica *et al.*, 2017; Guarraci *et al.*, 2023).

La regulación a la baja de la señalización de GnRH para la secreción de LH/FSH y esteroides sexuales es la base de las aplicaciones clínicas en ginecología y oncología ya que uno de los grandes problemas de la utilización de fármacos inductores de la ovulación es el riesgo de aparición del síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO), el cual se caracteriza por ser una respuesta supra fisiológica del ovario, desencadenada casi siempre por la administración exógena de gonadotropinas (Taylor *et al.*, 2010).

Por lo que el uso de LEU en combinación con otros fármacos (como antagonistas de GnRH o bien hCG) ha demostrado ser útil en tratamientos para la inducción de la ovulación al controlar y evitar la aparición de SHO en mujeres y animales de laboratorio (ratas) con un IMC dentro del rango de peso normal o saludable (Centeno, 2016; Taylor *et al.*, 2010). Sin embargo, se ha descrito que las pacientes con obesidad requieren dosis más altas de gonadotropinas y un periodo de estimulación más largo, además existen muy pocos estudios dedicados a establecer un protocolo viable de tratamientos para la inducción de la ovulación en estas pacientes (Polo, 2016; Crosignani *et al.*, 2003; Enríquez-Reyes, 2021).

Patel y Shah (2018), demostraron que la administración de LEU (2.5 µg/rata, s.c) durante 21 días, proporcionó una mejora en el desarrollo folicular de ratas con SOP lo que demuestra que dicho tratamiento podría ser un tratamiento útil para mejorar la fertilidad en dichos organismos.

JUSTIFICACIÓN

La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) (2019) indica que México tiene una de las tasas más altas de obesidad de entre los países que integran dicho organismo, ocupando el segundo lugar de las naciones con mayor índice de obesidad y de acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2020 sobre Covid-19, el 40.2% de las mujeres adultas en México presentan obesidad. Relacionado a lo anterior es importante resaltar que las mujeres obesas tienen tres veces más probabilidad de presentar problemas de infertilidad, a diferencia de las mujeres no obesas, tanto en ciclos naturales de ovulación espontánea como en ciclos de ovulación inducida en reproducción asistida (Barrios, Barrios y Vergara, 2013).

En México se practican anualmente 80 mil procedimientos de reproducción humana asistida, como inducción de ovulación, inseminación artificial, fecundación *in vitro*, transferencia de óvulos fecundados o transferencia intratubárica de gametos (Márquez, 2022). Específicamente en el tratamiento de inducción de la ovulación mediante el uso de fármacos, LEU ha demostrado ser eficiente en mujeres y animales de laboratorio (murinos) con un IMC dentro del rango de peso normal o saludable. Sin embargo, se ha explorado poco sobre su uso como agonista de GnRH y sobre todo el efecto que puede tener sobre hembras (mujeres y otros mamíferos) que padecen obesidad, puesto que la relación entre infertilidad y obesidad no ha recibido la suficiente atención en cuanto a la búsqueda de tratamientos de fertilidad para pacientes/organismos que padecen dicha patología.

El presente estudio tiene como finalidad evaluar el uso de LEU como agonista de GnRH en ratas Zucker obesas y determinar si dicho tratamiento es una alternativa viable para la estimulación de función ovárica y del espesor del revestimiento endometrial de dichos organismos.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto de la administración vía subcutánea (s.c) de acetato de leuprolide, a ratas hembra Zucker adultas en etapa reproductiva sobre la función ovárica y el grosor endometrial?

HIPÓTESIS

La administración subcutánea de acetato de leuprolide estimula la secreción de gonadotropinas (LH y FSH), estimulando la función ovárica y el grosor del endometrio en ratas Zucker adultas obesas.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el potencial terapéutico del acetato de leuprolide como agonista de GnRH para mejorar parámetros reproductivos en ratas Zucker adultas obesas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Determinar la dosis efectiva de LEU que resulte en la mejora de los parámetros zoométricos, metabólicos, y reproductivos, mediante la administración de tres dosis diferentes del agonista durante 3 días en ratas hembra Zucker obesa adulta.
- II. Evaluar los efectos de la dosis efectiva de LEU durante 21 días en la rata obesa Zucker sobre:
 - 1) Los parámetros zoométricos y la ingesta de alimentos.
 - 2) Perfil metabólico.
 - 3) Ciclo estral, ovulación y desarrollo folicular
 - 4) Grosor endometrial

METODOLOGÍA

Los animales empleados en este proyecto se adquirieron y se mantuvieron en el Bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). Todos los procedimientos se realizaron conforme a las directrices establecidas en la "Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio", así como las especificaciones detalladas en 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 hicieron todos los esfuerzos posibles para minimizar el sufrimiento de los animales y reducir la cantidad necesaria para el desarrollo del proyecto. Además, se siguieron los criterios aprobados por el Comité para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la BUAP en lo que respecta al manejo y la eutanasia, cabe destacar que el presente protocolo de investigación fue avalado por parte del CICUAL con el folio 100274222-UALVIEP-23/1, el 6 de noviembre de 2023.

Se emplearon en total 76 ratas hembra de dos cepas: Long-Evans y Obese Zucker Diabetic Fatty/Zucker Obesas (OZDF), todas con 90 días de edad, cuarenta animales (20 Long-Evans y 20 Obese Zucker Diabetic Fatty) fueron utilizados para la determinación de la dosis efectiva de LEU (duración del tratamiento: 3 días) , mientras que 36 ratas (18 Long-Evans y 18 Obese Zucker Diabetic Fatty) fueron destinadas al estudio experimental de la administración de LEU por 21 días. Todos los animales se mantuvieron en condiciones controladas, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, a una temperatura constante de 22 ± 1 °C. Los animales tuvieron acceso libre a alimento y agua, y se alojaron en grupos de al menos tres individuos por caja.

Diseño experimental

Determinación de la dosis efectiva de LEU (duración del tratamiento: 3 días)

Los animales se recibieron a los 60-70 días de edad y se asignaron aleatoriamente a cada uno de los grupos experimentales correspondientes. En la Figura 11 se presenta el diagrama general del diseño experimental para la determinación de la dosis efectiva de LEU.

Administración de la dosis efectiva de LEU (duración del tratamiento: 21 días)

Una vez determinada la dosis efectiva de LEU, se realizó un segundo experimento administrando la dosis efectiva 50 durante 21 días. Los animales se recibieron a los 60-70 días de edad y se asignaron aleatoriamente a cada uno de los grupos experimentales correspondientes, en la Figura 12 se presenta el diagrama general del diseño experimental para la administración de LEU por 21 días.

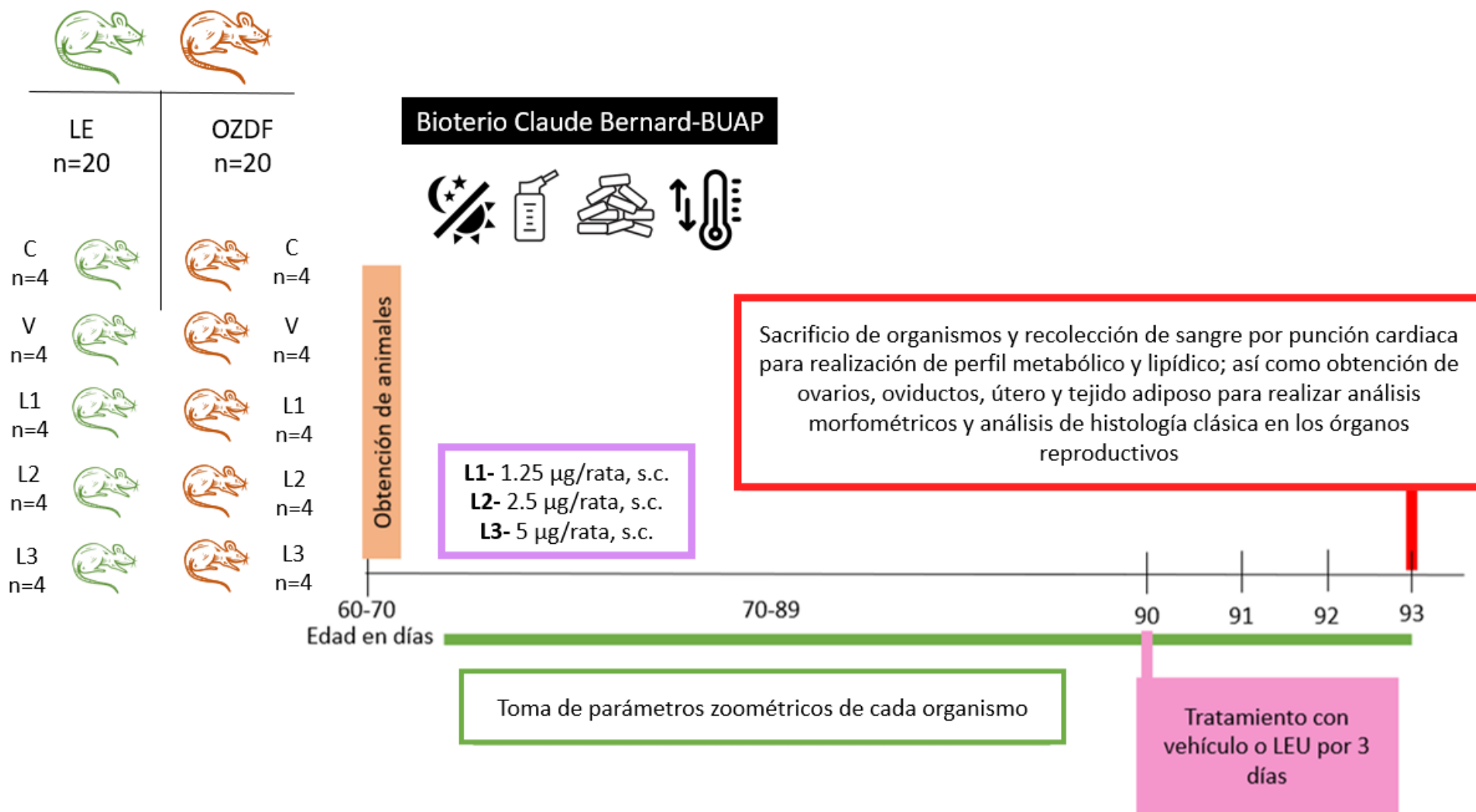


Figura 11. Diagrama de diseño experimental que muestra los diferentes grupos experimentales para la determinación de la dosis efectiva de LEU, así como los parámetros a evaluar durante el experimento en general.

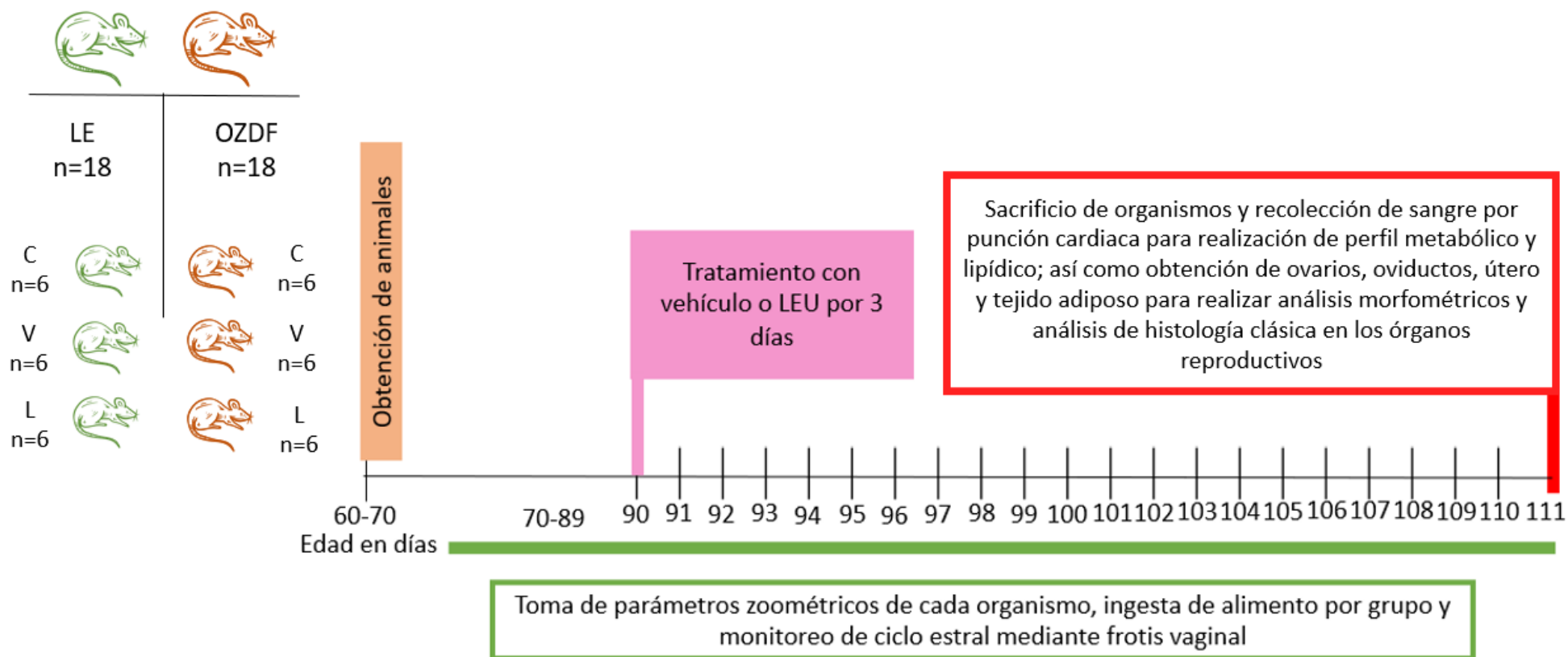


Figura 12. Diagrama de diseño experimental que muestra los diferentes grupos experimentales en la administración de LEU durante 21 días, así como los parámetros a evaluar durante el experimento en general.

Administración de LEU

El LEU (Sigma-Aldrich, L0399-1MG) se preparó mediante dilución en solución fisiológica estéril para obtener una concentración final de 10 µg/mL. La solución preparada se almacenó en alícuotas a -20 °C hasta su uso, con el objetivo de preservar la estabilidad del compuesto. LEU se administró según el esquema de cada grupo experimental. Las dosis fueron las siguientes: 1.25 µg/rata para los grupos LE+LEU 1 y OZDF+LEU 1, 2.5 µg/rata para los grupos LE+LEU 2 y OZDF+LEU 2, y 5 µg/rata para los grupos LE+LEU 3 y OZDF+LEU 3. Todas las administraciones se realizaron por vía subcutánea, diariamente durante tres días consecutivos. Al grupo control, se le administró vía subcutánea solución fisiológica como vehículo. Las dosis de LEU se seleccionaron a partir de un estudio previo (Patel y Shah, 2018) y mediante revisión bibliográfica.

Parámetros zoométricos y ciclo estral

Cada semana, desde el día 1 hasta el último día del tratamiento con LEU, se registró el peso corporal, mientras que, en el último día del tratamiento con LEU, se registró la circunferencia de abdomen, largo total de cada organismo, largo de la cabeza al ano y largo de la cola (Figura 13). Durante todo el experimento se monitoreó el ciclo estral de cada organismo mediante la toma diaria de frotis vaginales dejando un espacio de descanso de 12 días cada tres ciclos.

Peso corporal: Se determinó el peso del animal utilizando una balanza gramera digital (FUYO, SF 400 con sensibilidad de 1.0g-10000g). El proceso implicó en colocar al animal en un recipiente ligero (previamente pesado en la balanza) con el fin de medir su peso en gramos (g). Se aseguró que el animal permaneciera inmóvil y que la balanza se mantuviera en una posición estable durante la medición.

Longitud total: La longitud del animal se midió mientras permanecía en posición ventral sobre una superficie plana. Para ello, se utilizó una cinta métrica graduada en centímetros (cm), tomando como punto de referencia el hocico y extendiendo la medición hasta el extremo distal de la cola.

Longitud de la cola: La longitud de la cola se midió con el animal en posición ventral. Se empleó una cinta métrica graduada en centímetros (cm) y el punto de inicio de la medición fue el ano hasta el extremo de la cola para obtener la medición correspondiente.

Longitud del cuerpo: Se midió al animal en posición ventral utilizando una cinta métrica graduada en centímetros (cm). La medición comenzó desde el hocico hasta el punto de origen de la cola (el ano de la rata) para registrar la medida.

Circunferencia del abdomen: La circunferencia del abdomen se midió con el animal en posición dorsal, con las patas ligeramente separadas del cuerpo. Se utilizó una cinta métrica graduada en centímetros (cm). Se localizó la parte media del abdomen y se pasó la cinta métrica alrededor de esta área, ajustándola ligeramente para presionar los pelos del cuerpo. Finalmente, se tomó la lectura de la medición realizada.

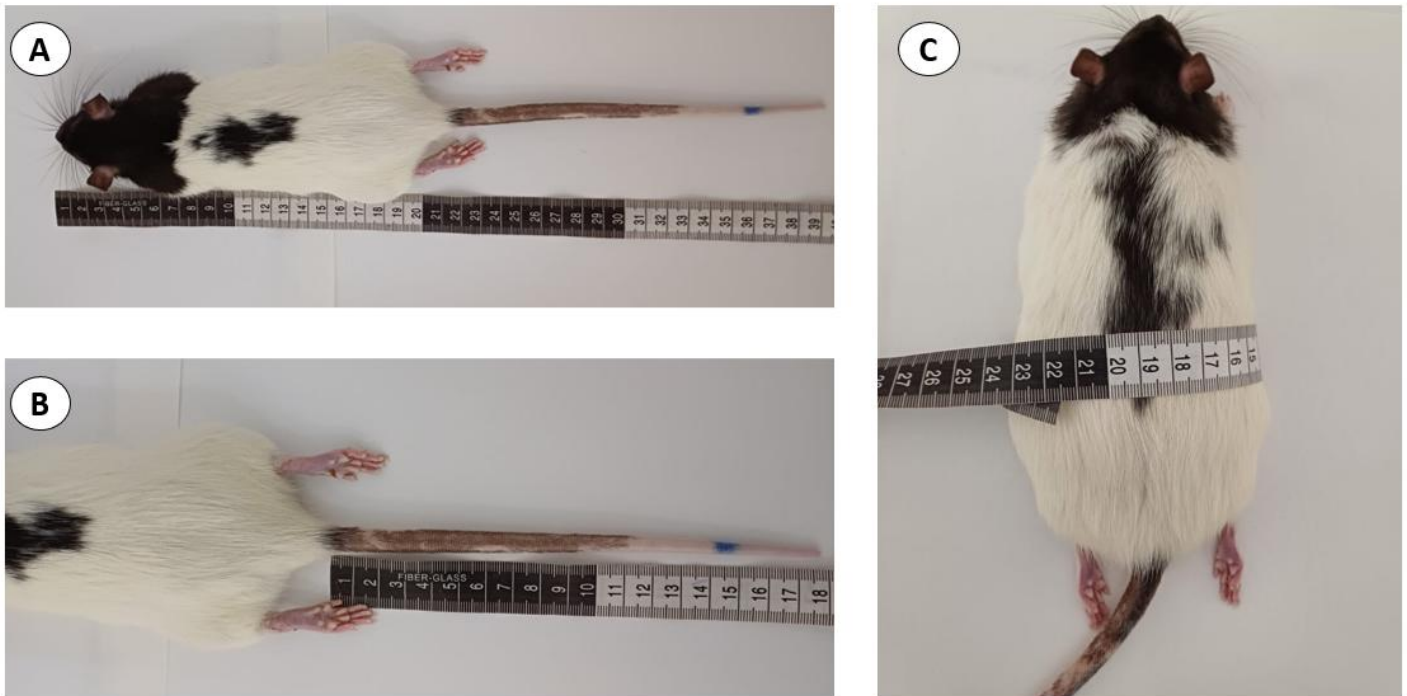


Figura 13. Toma de parámetro zoométricos. A) Longitud total, B) Longitud de la cola y C) Circunferencia del abdomen.

Obtención del frotis vaginal: Para determinar la fase del ciclo estral en la que se encontraba la rata al momento de la obtención de la muestra primero se esterilizó un asa de siembra y se calentó hasta quedar al rojo vivo en la llama de un mechero, luego se enfrió en agua destilada, se introdujo suavemente el asa esterilizada en la vagina de la rata y se giró para obtener una muestra adecuada.

Se extendió el frotis en varios portaobjetos y se tiñó con hematoxilina durante 5 minutos. Posteriormente, se enjuagó con agua de la llave. Luego, se aplicó eosina durante 30 segundos, seguido de un lavado con alcohol etílico, y se dejó evaporar el alcohol.

Se observó la muestra en el microscopio óptico (Zeiss, modelo Primo Star Pack 1) con un aumento de 32x veces, posteriormente se utilizaron criterios específicos para identificar las fases del ciclo estral basados en Cora, Kooistra y Travlos (2015).

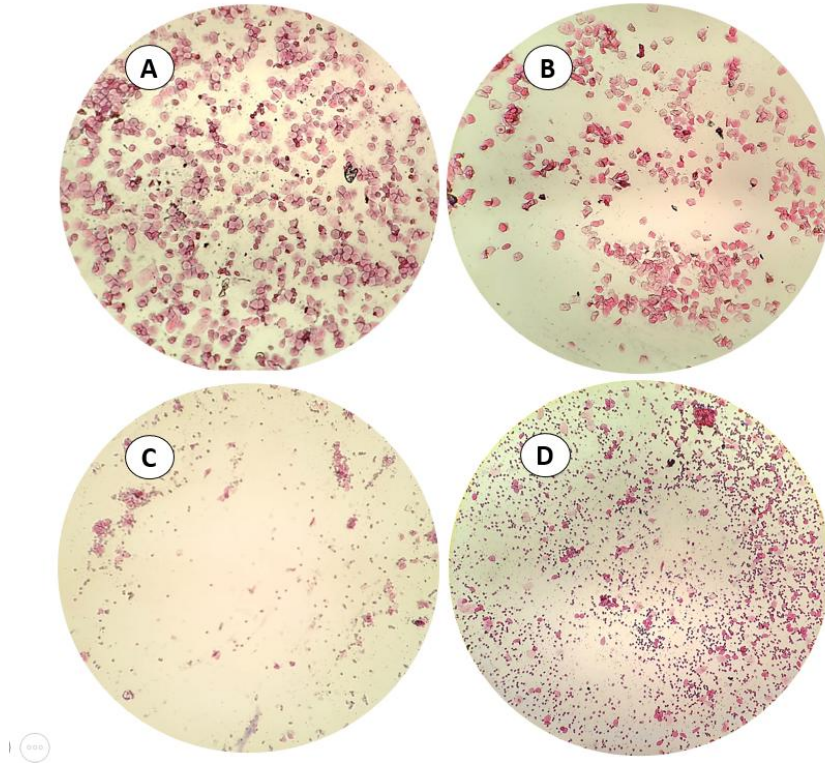


Figura 14. Imágenes representativas de cada fase del ciclo estral. A) Proestro, B) Estro, C) Metaestro y D) Diestro.

Procedimiento de autopsia

Antes de proceder a la autopsia, se tomaron registros del peso corporal de los animales. A continuación, los animales fueron sacrificados mediante una sobredosis de pentobarbital sódico 63 mg/mL. Una vez que los animales se encontraron completamente anestesiados, se obtuvo una muestra de sangre a través de punción cardíaca y se permitió que esta coagulara durante un período de 30 min. Posteriormente, el coágulo fue retirado y el resto de la muestra sanguínea se sometió a centrifugación a 3500 rpm durante 15 min (centrifuga MECCTP, 800-D). El suero resultante se separó en alícuotas de 100 μ L y se almacenó a una temperatura de -20°C hasta el momento en que se requiera para la cuantificación metabólica.

Además, durante la autopsia, se procedió a la disección de los ovarios, oviductos, hipófisis, glándulas adrenales, el útero y el tejido adiposo, y se registraron sus pesos utilizando una balanza de alta precisión (SARTORIUS, CP224S con sensibilidad de 0.1mg). Los ovarios y el útero se sometieron posteriormente a análisis histológicos convencionales. En el caso de los ovarios, se fijaron en solución Bouin durante 24 horas, se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol etílico (70%, 96% y 100%), se aclararon en cloroformo y se incluyeron en parafina histológica. Luego, se cortaron en secciones de 10 μ m de espesor y se montaron en portaobjetos gelatinizados. Estas secciones se mantuvieron en una cámara húmeda con formol durante 24 horas antes de proceder a su tinción mediante la técnica de hematoxilina-eosina. Posteriormente, se realizó el montaje de las

secciones utilizando resina sintética y se dejarón secar durante un período de dos semanas. En este proceso, se identificaron y contaron los cuerpos lúteos presentes en los ovarios, además de llevar a cabo el análisis de la población folicular.

Perfil metabólico Principio del formulario

Perfil metabólico post-sacrificio: La sangre obtenida durante el sacrificio, mediante la punción cardiaca, se utilizó para analizar la concentración de glucosa, colesterol y triglicéridos, como se detallará a continuación. Estos parámetros fueron considerados en conjunto como perfil metabólico de los animales.

La concentración de estas macromoléculas se determinó mediante un análisis fotométrico y se llevaron a cabo tres mediciones de cada muestra para cuantificar la concentración.

Glucosa: Para medir la glucosa en suero, se utilizó el KIT comercial de Valtek Glucosa (GOD PAP) para producir un compuesto coloreado que se leyó a una longitud de onda de 505 nm. Se emplearon 10 µL de suero y se añadió 1 mL de reactivo, agitando vigorosamente para garantizar una reacción homogénea. Luego, se incubó a temperatura ambiente durante 20 min (20° a 25°C) y se midió la absorbancia con un espectrofotómetro. Para obtener la concentración de glucosa de las muestras, se utilizaron 10 µL de VALTROL-C como solución estándar, que contenía 200 mg/dL de glucosa y se aplicaron las siguientes formulas:

$$\text{Factor} = \frac{\text{Concentración calibrador}}{\text{Absorbancia calibrador}}$$

$$\text{Glucosa (mg/dL)} = \text{Factor} * \text{Absorbancia muestra}$$

Colesterol: Para determinar los niveles de colesterol en suero, se empleó el KIT comercial de colesterol total Valtek (CHOD-PAP) para generar un compuesto coloreado que absorbió luz a 505 nm de longitud de onda. Se usaron 10 µL de suero heparinizado, a los que se añadió 1 mL del reactivo, y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente (>20°C). Luego se midieron las absorbancias llevando a cero el espectrofotómetro con el blanco del reactivo. Como solución estándar, se utilizaron 10 µL de VALTROL-C, que contenía 200 mg/dL de colesterol. La concentración de colesterol se calculó mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{Factor} = \frac{\text{Concentración calibrador}}{\text{Absorbancia calibrador}}$$

$$\text{Colesterol total (mg/dL)} = \text{Factor} * \text{Absorbancia muestra}$$

Triglicéridos: Para medir los triglicéridos, se empleó el kit comercial Triglicéridos (GPO – PAP) Valtek para generar un compuesto coloreado que se lee a 520 nm de longitud de onda. Se usaron 10 µL de suero heparinizado, a los que se añadió 1 mL del reactivo, y se incubó durante 5 minutos a 37°C. Luego se midieron las absorbancias llevando a cero el espectrofotómetro con el blanco del

reactivo. Como solución estándar, se utilizó 10 µL de VALTROL-C que contenía 200 mg/dL de triglicéridos. La concentración de triglicéridos en las muestras se calculó mediante las siguientes formulas:

$$\text{Factor} = \frac{\text{Concentración calibrador}}{\text{Absorbancia calibrador}}$$

$$\text{Triglicéridos (mg/dL)} = \text{Factor} * \text{Absorbancia muestra}$$

Análisis de ovulación

La evaluación de la ovulación se realizó mediante el conteo histológico de cuerpos lúteos en cortes ováricos previamente procesados. Los cortes fueron analizados utilizando un microscopio binocular (Zeiss, modelo Primo Star Pack 1) con un aumento de 32x veces, identificando la presencia de dichas estructuras cada 10 cortes en el seriado, con el fin de evitar duplicaciones en el conteo de un mismo cuerpo lúteo (Figura 15).

Se contabilizó la presencia de cuerpos lúteos en ambos ovarios de cada animal y posteriormente se obtuvo el promedio por animal. Este valor fue utilizado como indicador indirecto del número de ovulaciones ocurridas durante el ciclo estral previo al sacrificio.

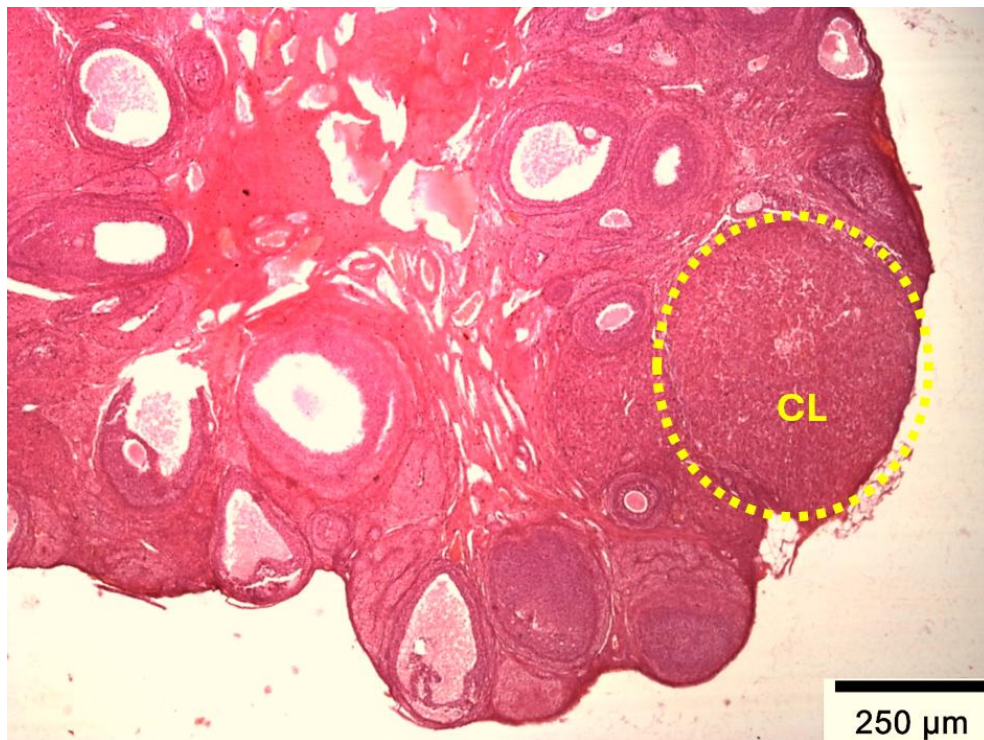


Figura 15. Imagen representativa de la determinación de cuerpos lúteos, CL: Cuerpo lúteo (4x, campo claro).

Análisis de la población folicular

El análisis de la población folicular se realizó en ambos ovarios (derecho e izquierdo) de cada animal. Los cortes histológicos fueron examinados mediante un microscopio binocular y con el apoyo del software Image-Pro, se identificaron y solo se midieron los folículos que contenían ovocitos con núcleo y nucléolo claramente definidos. El análisis se llevó a cabo cada 10 cortes por portaobjetos, a fin de evitar el conteo repetido de una misma estructura.

En cada corte se midieron únicamente los folículos que contenían ovocito. Para cada uno de ellos, se calculó el diámetro promedio a partir de dos medidas perpendiculares tomadas desde el borde externo de la teca a través del eje más largo y su perpendicular (Figura 16).

Se examinaron todas las secciones en busca de la presencia de quistes foliculares, siguiendo los criterios morfológicos propuestos por Brawer *et al.* (1986). Un quiste folicular se definió como una estructura que carecía de ovocito, presentaba una cavidad antral, una capa tecal engrosada y un epitelio de células de la granulosa delgado, típicamente limitado a una sola capa.

Los folículos fueron clasificados de acuerdo con el método descrito por Grasa *et al.* (2015) en folículos en desarrollo, antrales y preovulatorios (Tabla 4). Para cada tipo se midió su diámetro y se obtuvo un promedio utilizando la misma metodología.

Durante el proceso de clasificación, también se evaluó la morfología folicular para determinar el estado funcional de cada folículo (sano o atrésico). Se consideró que un folículo era atrésico cuando presentaba al menos una de las siguientes características: ovocito con picnosis nuclear, descamación de células de la granulosa o presencia de fenestraciones en la capa de la granulosa.

Tabla 4. Clasificación de folículos ováricos de acuerdo con Grasa *et al.* (2015).

Abreviatura	Tipo de folículo	Diámetro del folículo (µm)
D	En desarrollo	<400
A	Antrales	400-500
PO	Preovulatorio	>500

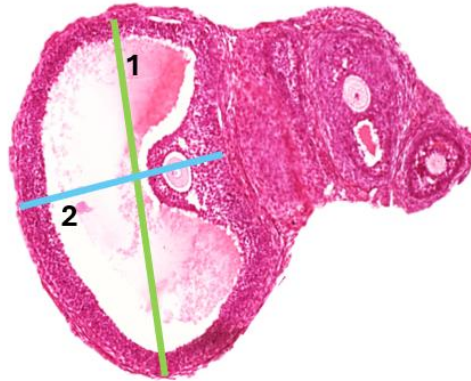


Figura 16. Medición del diámetro de folículos con ovocito, núcleo y nucléolo visibles en cortes histológicos ováricos. Se muestran los dos diámetros utilizados para calcular el tamaño promedio de cada folículo. La línea verde representa el primer diámetro (diámetro mayor) y la línea azul representa el diámetro perpendicular (diámetro menor).

Análisis del útero

Los úteros fueron fijados en solución de Bouin durante un período de 18 a 24 horas. Posteriormente, se deshidrataron en etanol en grados ascendentes (70%, 96% y 100%), se aclararon en cloroformo y se incluyeron en bloques de parafina histológica. Los bloques se cortaron utilizando un microtomo.

La obtención de cortes histológicos se realizó siguiendo la metodología descrita por Chávez-Genaro *et al.* (2022). Se llevaron a cabo cortes transversales de 5 μm de grosor en la zona medial de los cuernos uterinos, respecto a la vagina. Estas secciones se mantuvieron en una cámara húmeda con formol durante 24 horas antes de proceder a su tinción mediante la técnica de hematoxilina-eosina. Posteriormente, las secciones fueron montadas utilizando resina sintética y se dejaron secar durante un período de dos semanas.

Se tomaron fotografías de los cortes correspondientes a cada cuerno uterino con un aumento de 10x, capturando imágenes cada 50 μm con ayuda del software Image-Pro, una vez obtenidas las micrografías se realizaron dos trazos perpendiculares para obtener dos diámetros. Se consideró Diámetro 1 (D1) al de mayor longitud y Diámetro 2 (D2) al de menor longitud. El diámetro promedio se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Diámetro Promedio} = \frac{\text{Diámetro 1 (D1)} + \text{Diámetro 2 (D2)}}{2}$$

El espesor del endometrio se midió en una sección transversal del útero como la distancia vertical entre la interfaz endometrio-miometrial y la superficie endometrial. Se trazó manualmente un contorno alrededor de toda la sección uterina, incluyendo la luz y el límite entre el endometrio y el miometrio. Posteriormente, se delineó un segundo contorno que abarcó únicamente el área endometrial, incluyendo la luz uterina. Se colocaron 20 líneas equidistantes alrededor del endometrio. Estas líneas se trazaron manualmente para abarcar todo el corte histológico, rotándolas

18° entre cada trazo hasta completar las 20 líneas. Cada línea atravesó el corte histológico, y se midió su longitud para determinar el grosor del endometrio. Finalmente, se obtuvo el promedio general a partir de la suma de todas las mediciones.

Todas las mediciones se realizaron utilizando el software Image-Pro (versión 10).

Administración de LEU durante 21 días

La administración del fármaco LEU (2.5 µg/rata) se realizó diariamente por 21 días vía subcutánea, en el caso del grupo LE+L y OZDF+L. A los grupos vehículo se les administró solución fisiológica por vía subcutánea. La dosis de LEU se seleccionó a partir de los análisis de resultados obtenidos en la curva concentración respuesta. Se evaluaron los mismos parámetros zométricos que en la curva concentración-respuesta, modificando en esta ocasión la toma del peso corporal, longitud total, longitud de la cola, longitud del cuerpo y circunferencia del abdomen al momento de la entrega de los animales, al inicio del tratamiento y al finalizar el mismo. Además, se registró el consumo de alimento por grupo antes del tratamiento y durante el tratamiento. La observación del ciclo estral, el análisis de perfiles metabólicos y hormonales, así como la realización de análisis morfométricos e histológicos en órganos como ovarios y útero fueron exactamente igual que como se especificó anteriormente en el experimento de la curva concentración-respuesta (Figura 12).

Análisis estadístico

En todos los casos se realizaron pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) y se consideraron como diferencias estadísticamente significativas cuando la probabilidad fue menor a 0.05 ($p < 0.05$). Los datos no paramétricos se analizaron mediante Kruskal-Wallis, mientras que los datos paramétricos se analizaron utilizando una prueba de análisis de varianza (ANOVA). El análisis estadístico se realizó empleando el programa Past versión 3.17.

RESULTADOS

DETERMINACIÓN DE LA DOSIS EFECTIVA DE LEU:

Parámetros zoométricos

Longitud corporal

En cuanto a la longitud naso-anal y la longitud corporal total, no se observaron cambios tras la administración de LEU o vehículo en comparación con los grupos control absoluto, tanto en ratas obesas como en normopeso. Asimismo, no se detectaron diferencias significativas entre ratas obesas y delgadas en dichos parámetros (Tabla 5).

En contraste, la longitud de la cola fue significativamente menor en las ratas obesas respecto a las delgadas en todos los grupos experimentales. Por ejemplo, en el grupo control se observó una longitud de LE: 20.8 ± 0.7 cm vs OZDF: 17.3 ± 0.6 cm ($p = 7.97 \times 10^{-10}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey). Este mismo patrón se mantuvo en los grupos tratados con vehículo y con las distintas dosis de LEU, sin que se observaran diferencias significativas entre los tratamientos dentro de la cepa obesa (Tabla 5).

Peso corporal

El peso corporal al sacrificio (día 93) fue significativamente mayor en las ratas obesas en comparación con las ratas delgadas en todos los grupos experimentales ($p = 3.14 \times 10^{-7}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey). En el grupo control, las ratas LE presentaron un peso de 245.5 ± 2.9 g, mientras que las OZDF alcanzaron 353.25 ± 25.77 g. Un patrón similar se observó en el grupo vehículo, con valores de 255.5 ± 3.92 g en LE frente a 359.5 ± 23.63 g en OZDF.

El tratamiento con LEU no modificó significativamente este parámetro dentro de cada cepa. En el grupo L1, las ratas delgadas mostraron un peso de 244.5 ± 10.2 g, mientras que las obesas alcanzaron 338.25 ± 20.75 g. En el grupo L2, los valores fueron de 256.75 ± 6.1 g en LE frente a 363.75 ± 4.19 g en OZDF y en el grupo L3, de 252.5 ± 4.62 g en LE frente a 383.5 ± 32.37 g en OZDF (Figura 17, A).

Circunferencia abdominal

La circunferencia abdominal fue significativamente mayor en las ratas obesas en comparación con las delgadas en todos los tratamientos ($p = 1.36 \times 10^{-5}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey). En el grupo control, las ratas LE presentaron un valor de 15.40 ± 0.70 cm, mientras que las OZDF alcanzaron 19.62 ± 0.38 cm. Este mismo patrón se mantuvo en el grupo vehículo (LE: 15.96 ± 0.47 cm vs OZDF: 21.16 ± 0.65 cm) y en los grupos tratados con LEU.

En el grupo L1, las ratas delgadas mostraron una circunferencia de 15.65 ± 0.55 cm, frente a 20.30 ± 0.57 cm en las obesas. En el grupo L2, los valores fueron de 16.30 ± 0.10 cm en LE frente a 20.36 ± 0.58 cm en OZDF, mientras que en el grupo L3 se registraron 16.30 ± 0.10 cm en LE frente a 21.00 ± 1.27 cm en OZDF. En conjunto, estos resultados confirman que el fenotipo obeso se asocia con

una circunferencia abdominal significativamente mayor, y que ni el vehículo ni la administración de LEU modificaron este parámetro dentro de cada cepa (Figura 17, B).

Grasa pélvica y abdominal

El peso de la grasa pélvica y abdominal fue significativamente mayor en las ratas obesas en comparación con las delgadas en todos los tratamientos ($p = 4.86 \times 10^{-20}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey). En el grupo control, los valores fueron de (LE: 0.93 ± 0.26 g vs OZDF: 7.18 ± 0.80 g), mientras que en el grupo vehículo se observó un patrón similar (LE: 1.29 ± 0.14 g vs OZDF: 6.98 ± 0.82 g).

En los grupos tratados con LEU, las diferencias entre cepas se mantuvieron constantes. Así, en L1 los valores fueron de (LE: 1.09 ± 0.28 g vs OZDF: 7.96 ± 0.43 g); en L2 de (LE: 1.16 ± 0.24 g vs OZDF: 7.22 ± 0.53 g); y en L3 de (LE: 1.15 ± 0.20 g vs OZDF: 7.67 ± 0.47 g).

Estos resultados evidencian que las ratas OZDF presentan una marcada acumulación de tejido adiposo en la región pélvica y abdominal en comparación con las ratas delgadas y que ni el vehículo ni el tratamiento con LEU modificaron de forma significativa este parámetro dentro de cada cepa (Figura 17C–D).

Índice de adiposidad

El índice de adiposidad resultó consistentemente más elevado en las ratas obesas que en las delgadas en todos los grupos analizados ($p = 3.02 \times 10^{-19}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey). En el grupo control, los valores fueron de (LE: 0.0095 ± 0.0026 vs OZDF: 0.0777 ± 0.0094), mientras que en el grupo vehículo se mantuvo la misma diferencia (LE: 0.0130 ± 0.0015 vs OZDF: 0.0754 ± 0.0095).

En los grupos tratados con LEU, el patrón se mantuvo. En L1, los valores fueron de (LE: 0.0111 ± 0.0028 vs OZDF: 0.0865 ± 0.0051); en L2, de (LE: 0.0116 ± 0.0024 vs OZDF: 0.0722 ± 0.0052); y en L3, de (LE: 0.0115 ± 0.0020 vs OZDF: 0.0767 ± 0.0047).

En conjunto, los hallazgos confirman que el fenotipo obeso de las ratas OZDF se asocia con un índice de adiposidad marcadamente superior al de las ratas delgadas y que ni el vehículo ni las diferentes dosis de LEU produjeron cambios significativos en este parámetro dentro de cada cepa (Figura 17, E).

Tabla 5. Longitud naso anal, longitud de la cola y longitud total (cm) en ratas hembra LE y OZDF.

		Longitud naso anal (cm)	Longitud de la cola (cm)	Longitud total (cm)
DELGADAS	C	20.61 ± 0.12	20.05 ± 0.08	39.9 ± 0.27
	V	21.57 ± 0.16	20.35 ± 0.19	39.73 ± 0.37
	L1	21.25 ± 0.10	20.75 ± 0.29	39.9 ± 0.55
	L2	21.1 ± 0.18	19.67 ± 0.56	38.05 ± 0.8
	L3	20.85 ± 0.15	18.5 ± 0.35	38.16 ± 0.72
OBESAS	C	20.2 ± 0.26	*14.75 ± 0.26	34.5 ± 0.65
	V	20.5 ± 0.24	*15.02 ± 0.12	35.75 ± 0.56
	L1	20 ± 0.3	*15.37 ± 0.12	35.45 ± 0.49
	L2	20.9 ± 0.3	*16.42 ± 0.48	35.26 ± 1.15
	L3	19,95 ± 0,27	*15.7 ± 0.65	36 ± 1.20

Nota: Ratas hembra LE y OZDF n=4 por grupo (C, V, L1, L2 y L3) *p<0.05 LE vs OZDF (prueba ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Tukey). Abreviaturas: C = control; V = vehículo; L1 = leuprolide 1.25 µg/rata; L2 = leuprolide 2.5 µg/rata; L3 = leuprolide 5 µg/rata.

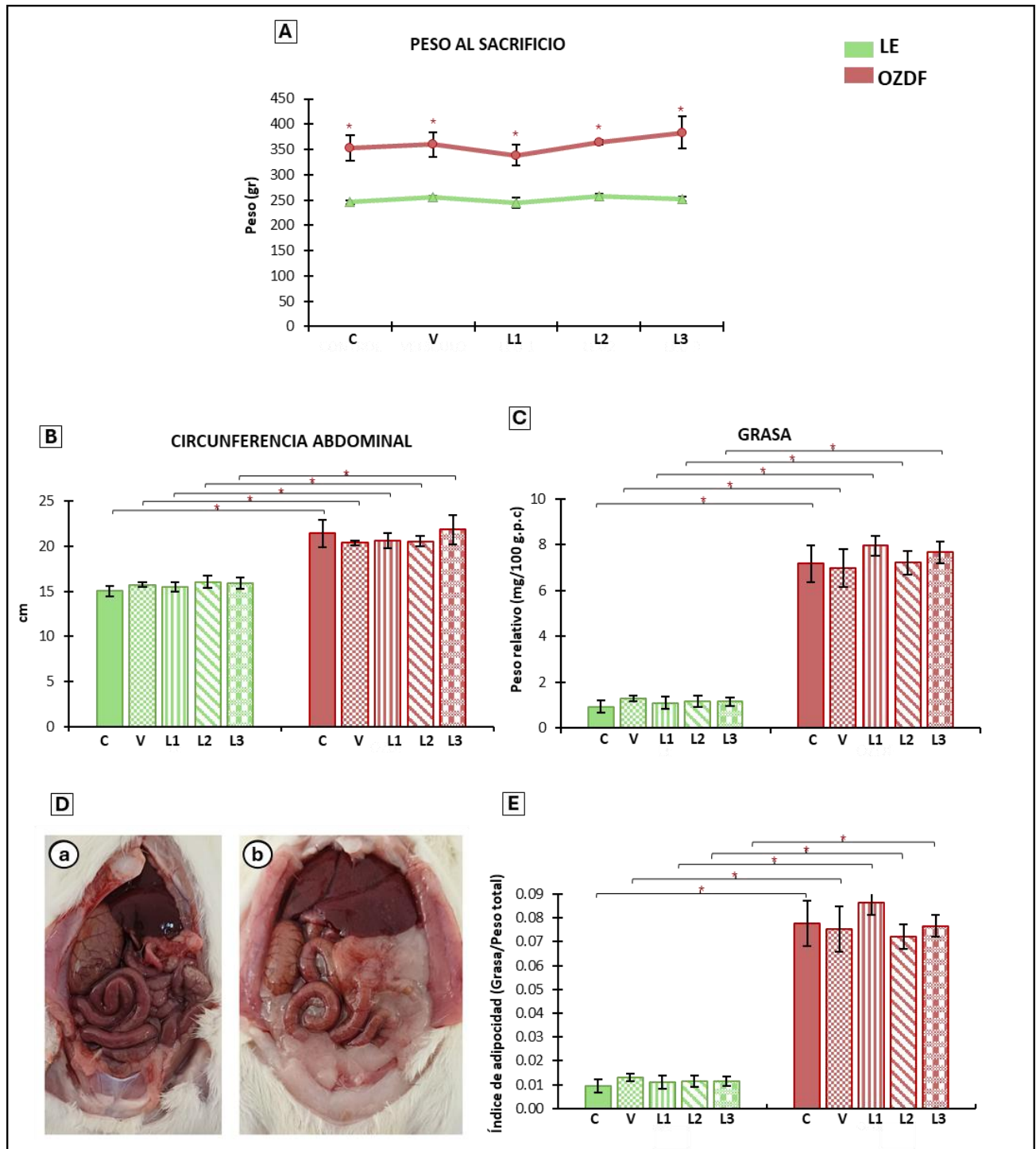


Figura 17. Parámetros zoométricos. **A)** Media \pm E.E. del peso corporal (g) de las hembras LE y OZDF. **B)** Media \pm E.E. del promedio de la circunferencia abdominal (cm) de las hembras LE y OZDF. **C)** Media \pm E.E. del peso (mg) de grasa pélvica y abdominal de las hembras LE y OZDF. **D)** Imágenes representativas del proceso de autopsia. **a)** Organismo Long Evans, **b)** Organismo Zucker Obeso, en las imágenes se puede observar la diferencia entre el tejido adiposo abdominal y pélvico en cada organismo, observándose un mayor porcentaje de este en el organismo Zucker Obeso. **E)** Media \pm E.E. del índice de adiposidad de las hembras LE y OZDF, n=4 por grupo (C, V, L1, L2 y L3), *p < 0.05 LE vs OZDF (prueba ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Tukey). Abreviaturas: C = control; V = vehículo; L1 = leuprolide 1.25 μ g/rata; L2 = leuprolide 2.5 μ g/rata; L3 = leuprolide 5 μ g/rata.

Perfil metabólico

Glucosa

Los niveles de glucosa plasmática fueron consistentemente más altos en las ratas obesas que en las delgadas en todos los grupos experimentales ($p = 6.16 \times 10^{-7}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey). En el grupo control, los valores correspondieron a (LE: 77.9 ± 14.7 mg/dL vs OZDF: 138.7 ± 6.2 mg/dL), mientras que en el grupo vehículo se mantuvo la misma diferencia (LE: 78.4 ± 14.9 mg/dL vs OZDF: 123.7 ± 10.3 mg/dL).

La administración de LEU no modificó de forma significativa este parámetro dentro de cada cepa. En el grupo L1, los valores fueron de (LE: 88.0 ± 12.8 mg/dL vs OZDF: 162.1 ± 7.5 mg/dL); en L2, de (LE: 89.9 ± 5.6 mg/dL vs OZDF: 149.8 ± 6.9 mg/dL); y en L3, de (LE: 76.9 ± 9.2 mg/dL vs OZDF: 152.6 ± 5.6 mg/dL).

En conjunto, los hallazgos confirman que el fenotipo obeso se asocia con una hiperglucemia marcada en comparación con las ratas normopeso, y que ni el vehículo ni el tratamiento con LEU en las diferentes dosis evaluadas ejercieron un efecto correctivo sobre este parámetro (Figura 18, A).

Triglicéridos

Los niveles de triglicéridos se encontraron marcadamente elevados en las ratas obesas en comparación con las delgadas en todos los grupos experimentales ($p = 6.09 \times 10^{-9}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey). En el grupo control, los valores fueron de (LE: 122.7 ± 18.4 mg/dL vs OZDF: 398.6 ± 53.6 mg/dL), mientras que en el grupo vehículo se mantuvo la misma diferencia (LE: 81.7 ± 22.9 mg/dL vs OZDF: 434.7 ± 29.6 mg/dL).

En los grupos tratados con LEU, las diferencias entre cepas permanecieron consistentes. Así, en L1 se registraron valores de (LE: 72.9 ± 8.1 mg/dL vs OZDF: 362.3 ± 85.7 mg/dL); en L2 de (LE: 66.5 ± 9.0 mg/dL vs OZDF: 389.2 ± 58.4 mg/dL); y en L3 de (LE: 77.8 ± 7.7 mg/dL vs OZDF: 509.7 ± 59.1 mg/dL).

Estos hallazgos refuerzan que el fenotipo obeso se asocia con una hipertrigliceridemia significativa en comparación con las ratas normopeso, y que ni el vehículo ni las distintas dosis de LEU ejercieron un efecto correctivo sobre este parámetro metabólico (Figura 18, B).

Colesterol

Los niveles de colesterol total fueron más elevados en las ratas obesas que en las delgadas en la mayoría de los grupos experimentales ($p = 4.26 \times 10^{-7}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey). En el grupo control, los valores fueron de (LE: 77.6 ± 3.4 mg/dL vs OZDF: 233.3 ± 28.8 mg/dL) y en el grupo vehículo se observaron resultados similares (LE: 86.3 ± 12.4 mg/dL vs OZDF: 229.1 ± 22.2 mg/dL).

En los grupos tratados con LEU, el mismo patrón se mantuvo: L1 mostró valores de (LE: 63.7 ± 4.9 mg/dL vs OZDF: 216.3 ± 16.7 mg/dL) y L3 de (LE: 60.1 ± 3.3 mg/dL vs OZDF: 227.4 ± 14.6 mg/dL).

No obstante, en el grupo L2 se observó una disminución significativa en los niveles de colesterol de las ratas obesas, con valores de 142.9 ± 13.9 mg/dL, en comparación con el grupo obeso control (233.3 ± 28.8 mg/dL; $t = 3.29$; $p = 1.66 \times 10^{-2}$; prueba t de Student), mientras que en las ratas delgadas los valores permanecieron estables (LE: 64.6 ± 4.9 mg/dL).

En conjunto, los resultados evidencian que el fenotipo obeso se asocia con una hipercolesterolemia marcada en comparación con las ratas normopeso y que únicamente la dosis intermedia de LEU (2.5 μ g/rata) fue capaz de inducir una reducción significativa en los niveles de colesterol de las ratas obesas (Figura 18, C).

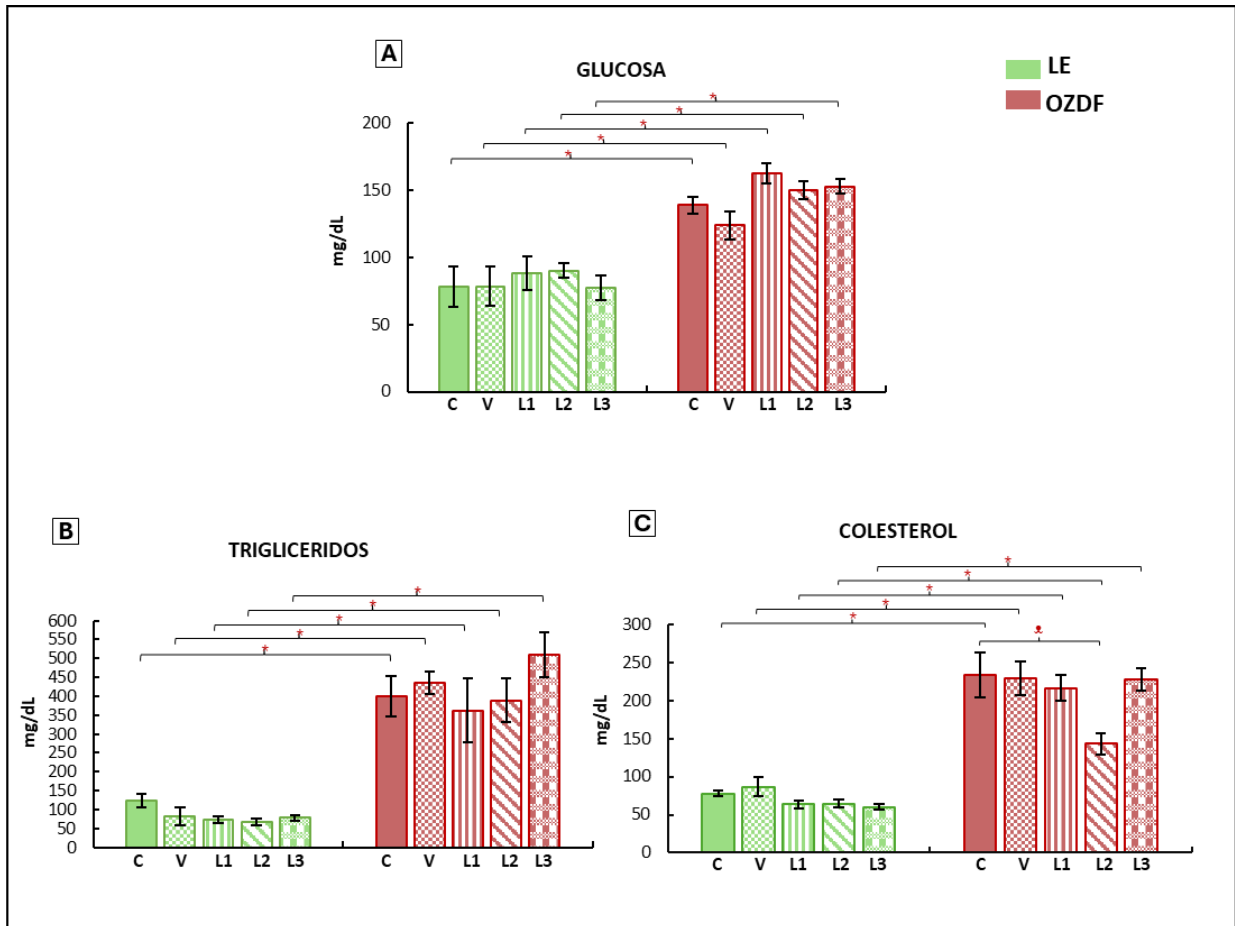


Figura 18. Perfil metabólico. **A)** Media \pm E.E. de niveles de glucosa sérica en las hembras LE y OZDF. **B)** Media \pm E.E. de niveles de triglicéridos séricos en las hembras LE y OZDF. **C)** Media \pm E.E. de niveles de colesterol sérico en las hembras LE y OZDF $n=4$ por grupo (C, V, L1, L2 y L3), * $p<0.05$ LE vs OZDF (prueba ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Tukey). ** $p<0.05$ OZDF+C vs OZDF+L2 (prueba t-student). Abreviaturas: C = control; V = vehículo; L1 = leuprolide 1.25 μ g/rata; L2 = leuprolide 2.5 μ g/rata; L3 = leuprolide 5 μ g/rata.

Peso relativo de los órganos

El análisis del peso relativo de la hipófisis (H) y de las glándulas adrenales derecha (AD) e izquierda (AI) evidenció que las principales diferencias se relacionaron con el fenotipo obeso más que con el tratamiento con LEU. En el grupo control, el peso de la hipófisis fue significativamente menor en las ratas obesas en comparación con las delgadas (LE: 11.61 ± 1.61 mg vs OZDF: 8.17 ± 0.12 mg; $p = 2.02 \times 10^{-5}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey). En las adrenales se observó una tendencia similar, aunque sin alcanzar significancia estadística: AD (LE: 11.29 ± 0.45 mg vs OZDF: 7.79 ± 0.27 mg) y AI (LE: 11.61 ± 1.61 mg vs OZDF: 8.17 ± 0.12 mg) (Figura 19 A–C).

En el grupo vehículo se mantuvo este patrón. El peso hipofisario fue de (LE: 12.0 ± 0.71 mg vs OZDF: 8.53 ± 0.41 mg; $p < 0.05$ ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey), mientras que en las adrenales los valores fueron cercanos entre cepas y no mostraron diferencias significativas: AD (LE: 11.19 ± 0.92 mg vs OZDF: 8.60 ± 0.68 mg); AI (LE: 12.0 ± 0.71 mg vs OZDF: 8.53 ± 0.41 mg).

En los grupos tratados con LEU, los valores se mantuvieron sin modificaciones relevantes. En L1, los pesos hipofisarios fueron de (LE: 10.73 ± 0.45 mg vs OZDF: 9.14 ± 0.72 mg) y las adrenales de AD (LE: 10.40 ± 0.95 mg vs OZDF: 9.41 ± 0.87 mg) y AI (LE: 10.73 ± 0.45 mg vs OZDF: 9.14 ± 0.72 mg). En L2, los valores fueron de H (LE: 11.97 ± 0.61 mg vs OZDF: 9.18 ± 0.23 mg), AD (LE: 11.14 ± 0.74 mg vs OZDF: 8.58 ± 1.13 mg) y AI (LE: 11.97 ± 0.61 mg vs OZDF: 9.18 ± 0.23 mg). Finalmente, en L3 los valores fueron más homogéneos, sin diferencias estadísticamente significativas: H (LE: 9.67 ± 1.33 mg vs OZDF: 9.07 ± 0.56 mg), AD (LE: 10.86 ± 0.54 mg vs OZDF: 8.69 ± 0.78 mg) y AI (LE: 9.67 ± 1.33 mg vs OZDF: 9.07 ± 0.56 mg).

En conjunto, estos resultados muestran que el peso relativo de la hipófisis es consistentemente menor en las ratas obesas frente a las delgadas, diferencia que fue significativa en los grupos control y vehículo. En contraste, las glándulas adrenales no presentaron variaciones relevantes ni entre cepas ni tras el tratamiento con LEU, independientemente de la dosis administrada (Figura 19 A–C).

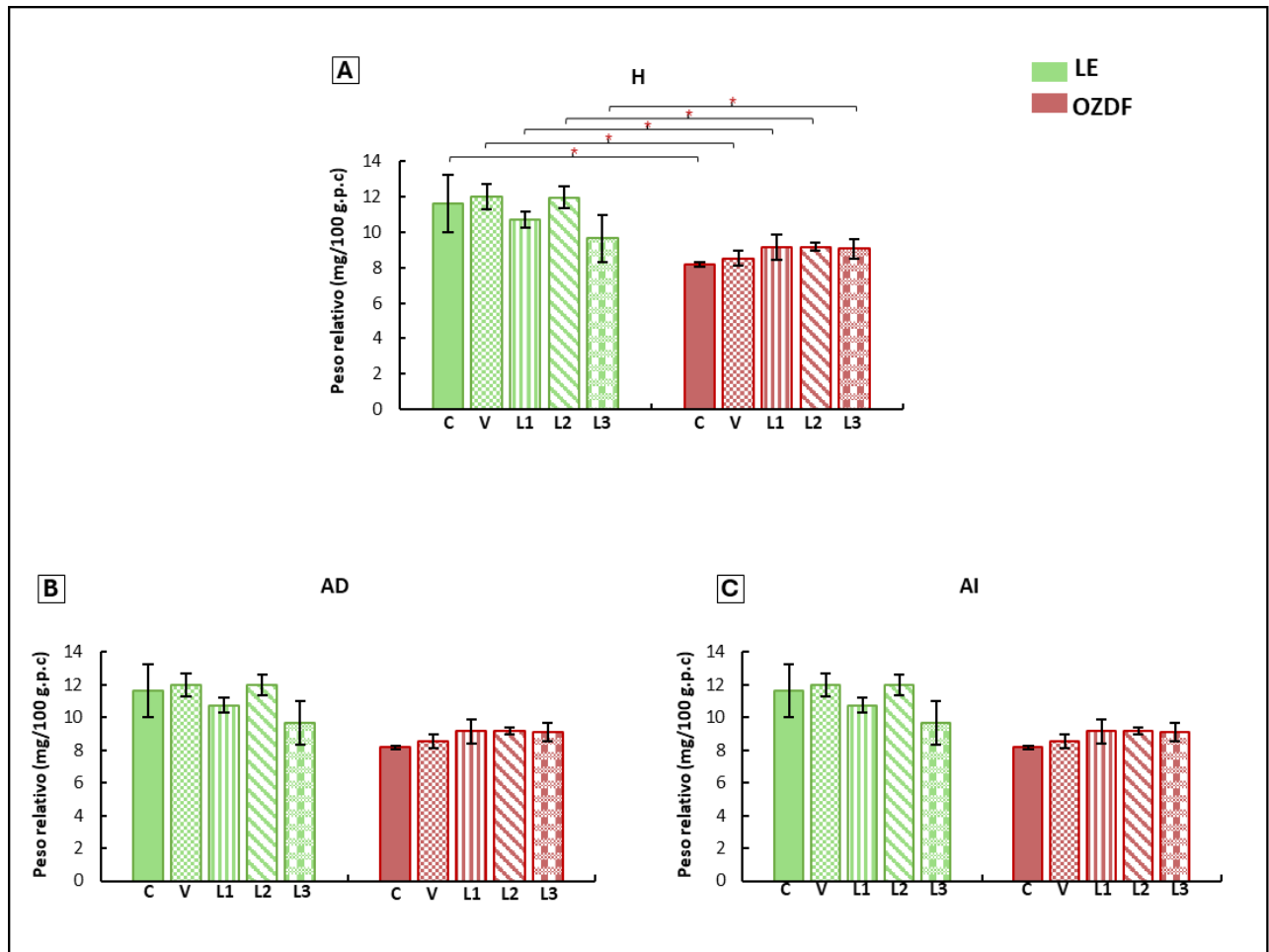


Figura 19. Peso relativo de órganos. **A)** Media \pm E.E. del peso (mg) de hipófisis (H) de las hembras LE y OZDF **B)** Media \pm E.E. del peso (mg) de la glándula adrenal derecha (AD) de las hembras LE y OZDF **C)** Media \pm E.E. del peso (mg) de la glándula adrenal derecha (AI) de las hembras LE y OZDF n=4 por grupo (C, V, L1, L2 y L3) *p<0.05 LE vs OZDF (prueba ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Tukey). Abreviaturas: C = control; V = vehículo; L1 = leuprolide 1.25 µg/rata; L2 = leuprolide 2.5 µg/rata; L3 = leuprolide 5 µg/rata.

Parámetros reproductivos

Peso relativo de órganos reproductivos

El análisis del peso relativo de los ovarios y del útero mostró diferencias consistentes entre cepas, con efectos puntuales del tratamiento con LEU (Figura 20 A–D).

En el grupo control, el peso del ovario derecho (OD) fue significativamente menor en las ratas obesas respecto a las delgadas (LE: 11.84 ± 0.50 mg vs OZDF: 6.27 ± 0.59 mg; $p = 5.49 \times 10^{-4}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey). Un patrón semejante se observó en el ovario izquierdo (OI) con valores de (LE: 14.80 ± 1.12 mg vs OZDF: 7.23 ± 0.39 mg; $p = 1.00 \times 10^{-5}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey). La masa ovárica total también resultó significativamente menor en las obesas (LE: 26.64 ± 1.29 mg vs OZDF: 13.50 ± 0.82 mg; $p = 8.59 \times 10^{-7}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey). En cuanto al útero, se observó una reducción marcada en las OZDF (LE: 178.45 ± 19.8 mg vs OZDF: 51.04 ± 5.61 mg; $p = 1.91 \times 10^{-10}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey).

En el grupo vehículo se mantuvo la misma tendencia: OD (LE: 14.74 ± 1.05 mg vs OZDF: 6.61 ± 0.53 mg; $p = 7.54 \times 10^{-7}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey), OI (LE: 15.11 ± 1.02 mg vs OZDF: 8.36 ± 0.90 mg; $p = 7.42 \times 10^{-5}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey), masa ovárica (LE: 29.85 ± 1.38 mg vs OZDF: 14.97 ± 0.95 mg; $p = 5.88 \times 10^{-8}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey) y útero (LE: 174.49 ± 5.43 mg vs OZDF: 62.19 ± 8.04 mg; $p = 4.48 \times 10^{-9}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey).

En los grupos tratados con LEU, el peso de los ovarios se mantuvo menor en las obesas. En L1, el OD fue de (LE: 11.20 ± 1.65 mg vs OZDF: 7.82 ± 0.91 mg) y el OI de (LE: 13.10 ± 0.54 mg vs OZDF: 7.28 ± 1.25 mg; $p = 3.01 \times 10^{-3}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey). En L2, los valores fueron de OD (LE: 12.77 ± 0.62 mg vs OZDF: 7.96 ± 1.14 mg; $p = 1.25 \times 10^{-2}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey) y OI (LE: 13.66 ± 0.83 mg vs OZDF: 8.23 ± 1.28 mg; $p = 6.56 \times 10^{-3}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey). En L3, los resultados fueron OD (LE: 12.46 ± 0.70 mg vs OZDF: 7.20 ± 0.37 mg; $p = 4.71 \times 10^{-3}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey) y OI (LE: 12.20 ± 0.54 mg vs OZDF: 8.45 ± 0.66 mg; $p = 1.34 \times 10^{-2}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey (Figura 20 A–B).

La masa ovárica total se mantuvo reducida en las obesas en todos los grupos ($p = 7.70 \times 10^{-15}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey), aunque en OZDF-L2 se observó un incremento no significativo (16.19 ± 2.29 mg vs 13.50 ± 0.82 mg en control).

En el útero, la reducción de peso fue un hallazgo constante en las obesas respecto a las delgadas ($p = 1.32 \times 10^{-14}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey). Además, el tratamiento con LEU redujo significativamente el peso uterino en ambas cepas: en L1, (OZDF: 38.98 ± 1.77 mg vs control: 51.04 ± 5.61 mg; $t = 3.04$; $p = 2.20 \times 10^{-2}$; prueba t de Student) y (LE: 90.37 ± 9.34 mg vs control: 178.45 ± 19.8 mg; $t = 3.68$; $p = 7.70 \times 10^{-3}$; prueba t de Student); en L2, (OZDF: 49.84 ± 7.40 mg vs control: 51.04 ± 5.61 mg; $t = 3.74$; $p = 9.50 \times 10^{-3}$; prueba t de Student) y (LE: 91.02 ± 4.48 mg vs control: 178.45 ± 19.8 mg; $t = 3.84$; $p = 6.30 \times 10^{-3}$; prueba t

de Student); en L3, (OZDF: 51.33 ± 2.01 mg vs control: 51.04 ± 5.61 mg; $t = 2.71$; $p = 3.40 \times 10^{-2}$; prueba t de Student) y (LE: 91.18 ± 6.02 mg vs control: 178.45 ± 19.8 mg; $t = 3.78$; $p = 6.80 \times 10^{-3}$; prueba t de Student) (Figura 20, D).

En conjunto, los resultados demuestran que el fenotipo obeso se asocia con ovarios y útero de menor peso relativo frente a las ratas normopeso, y que la administración de LEU no revirtió estas diferencias, aunque sí produjo una reducción adicional del peso uterino en ambas cepas.

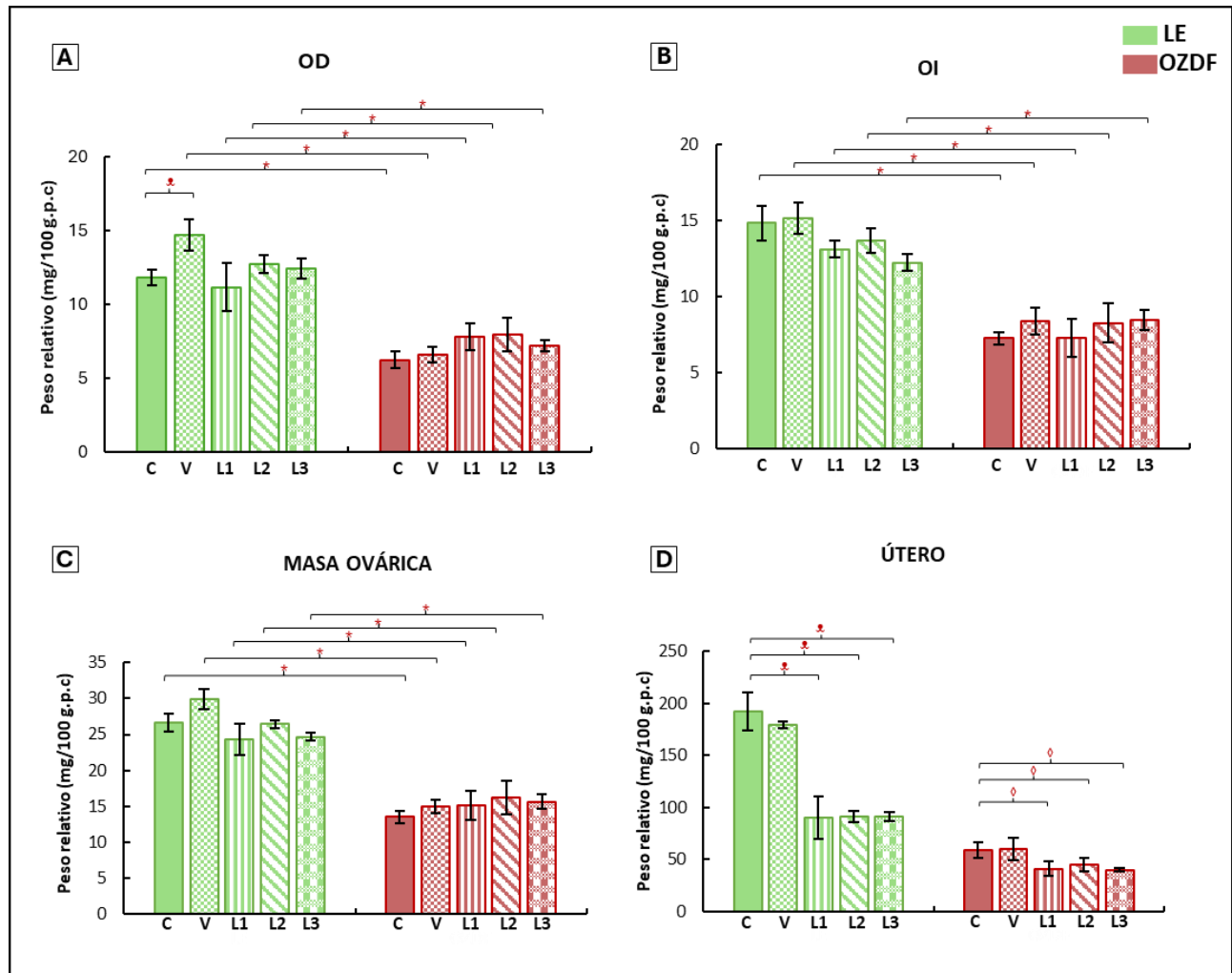


Figura 20. Peso relativo de órganos reproductivos. **A)** Media \pm E.E. del peso (mg) del ovario derecho (OD) de las hembras LE y OZDF * $p < 0.05$ LE vs OZDF (prueba ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey) * $p < 0.05$ LE+V vs LE+C (prueba t-student). **B)** Media \pm E.E. del peso (mg) del ovario izquierdo (OI) de las hembras LE y OZDF **C)** Media \pm E.E. de masa ovárica (mg) de las hembras LE y OZDF. **D)** Media \pm E.E. del peso (mg) uterino de las hembras LE y OZDF $n = 4$ por grupo (C, V, L1, L2 y L3), * $p < 0.05$ LE vs OZDF (prueba ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Tukey) * $p < 0.05$ LE+C y LE+V 2 vs LE+L1, LE+L2 y LE+L3 (prueba t-student). $\diamond p < 0.05$ OZDF+C y OZDF+V vs OZDF+L1, OZDF+L2 y OZDF+L3 (prueba t-student). Abreviaturas: C = control; V = vehículo; L1 = leuprolide 1.25 $\mu\text{g}/\text{rata}$; L2 = leuprolide 2.5 $\mu\text{g}/\text{rata}$; L3 = leuprolide 5 $\mu\text{g}/\text{rata}$.

Análisis histológico de tejidos reproductivos

Ovarios

Se realizó un análisis histológico en ambos ovarios de cada animal para evaluar parámetros relacionados con la función ovárica, incluyendo el conteo de cuerpos lúteos y la población folicular (Tabla 6, Figura 21).

Cuerpos lúteos

Las ratas obesas presentaron un menor número de cuerpos lúteos en comparación con las normopeso, indicando una disminución en la capacidad ovulatoria (OZDF+C: 6.2 ± 1.46 vs LE+C: 13.6 ± 0.81 ; $p = 3.28 \times 10^{-4}$; prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc Dunn). La administración de LEU incrementó el número de cuerpos lúteos en las OZDF, con un efecto más marcado en la dosis de 2.5 $\mu\text{g}/\text{rata}$ (OZDF+L2: 9.5 ± 1.55 vs OZDF+C: 6.2 ± 1.46 ; $p = 2.84 \times 10^{-2}$; prueba U de Mann-Whitney). En contraste, en las ratas LE se observó una disminución significativa con la dosis de 5 $\mu\text{g}/\text{rata}$ (LE+L3: 8.5 ± 1.04 vs LE+C: 13.6 ± 0.81 ; $p = 1.16 \times 10^{-2}$; prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc Dunn) (Tabla 6, A).

Población folicular

En cuanto a los folículos sanos, las ratas obesas mostraron menores cantidades respecto a las normopeso. El tratamiento con LEU aumentó significativamente este parámetro en las obesas tratadas con 2.5 $\mu\text{g}/\text{rata}$ (OZDF+L2: 101 ± 28.67 vs OZDF+C: 37.25 ± 10.88 ; $p = 3.04 \times 10^{-2}$; prueba U de Mann-Whitney). En las LE, el número de folículos sanos disminuyó de forma significativa con 2.5 $\mu\text{g}/\text{rata}$ (LE+L2: 93.5 ± 9.5 vs LE+C: 195 ± 24.92 ; $p = 1.28 \times 10^{-2}$; prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc Dunn) y con 5 $\mu\text{g}/\text{rata}$ (LE+L3: 108 ± 13.04 vs LE+C: 195 ± 24.92 ; $p = 4.75 \times 10^{-2}$; prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc Dunn), lo que sugiere un posible efecto adverso a dosis altas (Tabla 6, B).

Respecto a los folículos atrésicos, las ratas obesas mostraron una cantidad significativamente mayor que las delgadas ($p = 1.97 \times 10^{-4}$; prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc Dunn). El tratamiento con LEU no modificó este parámetro en las obesas, mientras que en las delgadas se observó un aumento dosis-independiente (LE+L1: 91.25 ± 14.03 vs LE+C: 26.75 ± 1.79 ; $p = 7.74 \times 10^{-3}$; LE+L2: 120.75 ± 8.82 vs LE+C: 26.75 ± 1.79 ; $p = 1.96 \times 10^{-2}$ y LE+L3: 107.25 ± 7.08 vs LE+C: 26.75 ± 1.79 ; $p = 4.91 \times 10^{-3}$; prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc Dunn) (Tabla 6, B).

En cuanto a los folículos totales, las ratas obesas presentaron menos que las delgadas ($p = 5.80 \times 10^{-6}$; prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc Dunn). El tratamiento con LEU en las obesas mostró un incremento no significativo en el grupo L2 (OZDF+L2: 181 ± 40.13 vs OZDF+C: 125.75 ± 19.6), mientras que en las LE no hubo cambios relevantes (Tabla 6, B).

Desarrollo folicular

El análisis del desarrollo folicular reveló que las ratas delgadas control y vehículo presentaron mayor número de folículos en desarrollo, antrales y preovulatorios que las obesas de los grupos control, vehículo y L3 ($p < 0.05$; prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc Dunn). En LE, el tratamiento con 2.5 $\mu\text{g/rata}$ redujo significativamente los folículos en desarrollo (LE+L2: 156.5 ± 11.55 vs LE+C: 178.75 ± 9.28 ; $p = 4.12 \times 10^{-2}$; prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc Dunn), al igual que con 5 $\mu\text{g/rata}$ (LE+L3: 153.25 ± 14.46 vs LE+C: 178.75 ± 9.28 ; $p = 4.16 \times 10^{-2}$; prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc Dunn). Además, la dosis de 1.25 $\mu\text{g/rata}$ redujo los folículos antrales (LE+L1: 11.5 ± 1.55 vs LE+C: 18 ± 2.35 ; $p = 2.45 \times 10^{-2}$; prueba U de Mann-Whitney) y preovulatorios (LE+L1: 36.5 ± 5.56 vs LE+C: 52.5 ± 5.83 ; $p = 4.59 \times 10^{-2}$; prueba U de Mann-Whitney) (Tabla 6, C).

En las OZDF, el tratamiento con 1.25 y 2.5 $\mu\text{g/rata}$ de LEU mostró una tendencia al incremento de folículos en desarrollo (OZDF+L2: 142 ± 35.28 vs OZDF+C: 95 ± 16.38) y antrales (OZDF+L2: 12.5 ± 2.72 vs OZDF+C: 5.75 ± 1.6), aunque estas diferencias no alcanzaron significancia. No se observaron cambios relevantes en el número de folículos preovulatorios.

En conjunto, estos hallazgos evidencian que las ratas obesas presentan una menor población folicular y un compromiso de la función ovárica frente a las delgadas, con un efecto del tratamiento con LEU que varía según la dosis y el tipo de folículo evaluado (Tabla 6, Figura 21).

Tabla 6. Análisis histológico de ovarios.

A				
PRESENCIA DE CUERPOS LÚTEOS				
TRATAMIENTO	CEPA			
	LE	OZDF		
C	13.6 ± 0.81	*6.2 ± 1.46		
V	12.8 ± 2.24	*6 ± 1.51		
L1	11 ± 0.7	*8.75 ± 1.37		
L2	10.25 ± 0.75	*9.5 ± 1.55		
L3	*8.5 ± 1.04	*8.75 ± 0.47		

B				
POBLACIÓN FOLICULAR				
		Foliculos sanos	Foliculos atrésicos	Foliculos totales
DELGADAS	C	195 ± 24.92	26.75 ± 1.79	249.25 ± 12.84
	V	200.13 ± 27.75	48.02 ± 12	261 ± 22.75
	L1	140.5 ± 23.08	*91.25 ± 14.03	231.75 ± 20.08
	L2	*93.5 ± 9.5	*120.75 ± 8.82	214.25 ± 16.10
	L3	*108 ± 13.04	*107.25 ± 7.08	215 ± 17.09
OBESAS	C	*37.25 ± 10.88	*88.5 ± 16.73	*125.75 ± 19.6
	V	*33.75 ± 9.83	*79 ± 6.83	*112.75 ± 5.03
	L1	*78.75 ± 22.63	75 ± 29.14	153.75 ± 51.28
	L2	*101 ± 28.67	*80 ± 12.41	181 ± 40.13
	L3	*73.5 ± 12.46	62.25 ± 19.14	*135.75 ± 31.3

C				
DESARROLLO FOLICULAR				
		En desarrollo (<400 µm)	Antrales (400-500 µm)	Preovulatorios (>500 µm)
DELGADAS	C	178.75 ± 9.28	18 ± 2.35	52.5 ± 5.83
	V	188 ± 4.45	18 ± 1.47	50 ± 3.67
	L1	183.75 ± 16.66	*11.5 ± 1.55	*36.5 ± 5.56
	L2	*156.5 ± 11.55	13 ± 4.20	44.75 ± 16.10
	L3	*153.25 ± 14.46	11.75 ± 2.80	50.25 ± 5.32
OBESAS	C	*95 ± 16.38	*5.75 ± 1.6	*25 ± 4.52
	V	*98.75 ± 7.36	*7 ± 0.91	*24.75 ± 2.39
	L1	113 ± 39.87	11.25 ± 4.15	*26.5 ± 5.69
	L2	142 ± 35.28	12.5 ± 2.72	29.5 ± 9.18
	L3	*107.5 ± 25.10	*6.75 ± 2.86	*21.5 ± 5.33

Nota: **A)** Presencia de cuerpos lúteos en ratas hembra LE y OZDF. **B)** Media ± E.E. de la población folicular de foliculos sanos, atrésicos y totales presentes en ambos ovarios en hembras LE y OZDF. **C)** Media ± E.E. del desarrollo folicular presente en ambos ovarios en hembras LE y OZDF, n=4 por grupo (C, V, L1, L2 y L3) *p<0.05 LE+C vs LE+V, LE+L1, LE+L2, LE+L3, OZDF+C, OZDF+V, OZDF+L1, OZDF+L2 y OZDF+L3 (prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc Dunn). *p<0.05 OZDF (V, L1, L2 y L3) vs OZDF+C (prueba U de Mann-Whitney). Abreviaturas: C = control; V = vehículo; L1 = leuprolide 1.25 µg/rata; L2 = leuprolide 2.5 µg/rata; L3 = leuprolide 5 µg/rata.

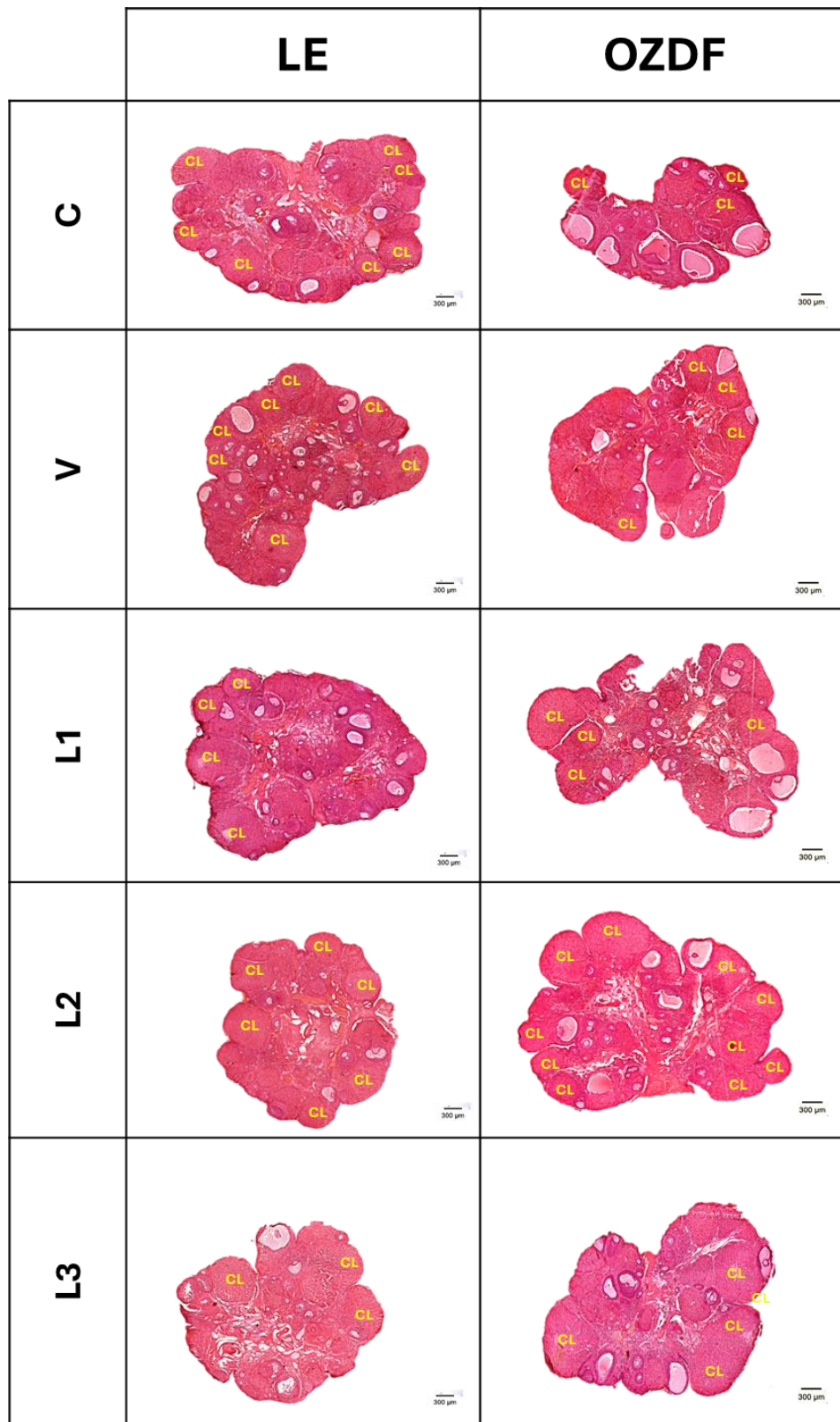


Figura 21. Cortes histológicos de ovario representativos de ratas hembra LE y OZDF (CL: cuerpo lúteo). Abreviaturas: C = control; V = vehículo; L1 = leuprolide 1.25 $\mu\text{g}/\text{rata}$; L2 = leuprolide 2.5 $\mu\text{g}/\text{rata}$; L3 = leuprolide 5 $\mu\text{g}/\text{rata}$.

Útero

Se realizó un análisis histológico del cuerno uterino izquierdo de cada animal para evaluar parámetros morfológicos asociados a la funcionalidad uterina, específicamente el diámetro uterino y el grosor endometrial (Tabla 7, Figura 22).

Diámetro uterino

Las ratas obesas presentaron un diámetro uterino significativamente menor en comparación con las ratas normopeso (OZDF vs LE; $p = 2.03 \times 10^{-5}$; prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc Dunn). Además, la administración de acetato de leuprolide redujo de manera significativa este parámetro en ambos grupos experimentales ($p < 0.05$; prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc Dunn), lo que indica que tanto el fenotipo obeso como el tratamiento con LEU influyen negativamente en el diámetro uterino.

Grosor endometrial

De manera consistente, el grosor endometrial fue menor en las ratas obesas respecto a las normopeso. Asimismo, la administración de acetato de leuprolide disminuyó significativamente este parámetro en ambas cepas ($p < 0.05$; prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc Dunn), evidenciando que la obesidad y la exposición al fármaco contribuyen a un endometrio más delgado (Tabla 7, Figura 22).

Tabla 7. Diámetro uterino y grosor endometrial.

	LE					OZDF				
	C	V	L1	L2	L3	C	V	L1	L2	L3
Diámetro uterino (μm)	2275.40± 20.82	2025.40± 171.13	◇*1342.53± 68.85	◇*1504.44± 30.23	◇*1518.96± 114.72	*1598.45± 48.64	*1382.76± 19.44	✖*1212.12± 15.18	✖*1130.80± 11.88	✖*1176.87± 50.78
Grosor endometrial (μm)	361.04± 19.13	286.03± 37.24	◇*186.88± 6.81	◇*159.97± 18.43	◇*149.78± 8.25	*208.81± 7.33	*196.53± 17.97	✖*137.30± 15.74	✖*120.81± 9.61	✖*141.32± 6.03

Nota: Ratas LE y OZDF. n=4 por grupo (C, V, L1, L2 y L3) * $p < 0.05$ LE vs OZDF (prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc Dunn). ◇ $p < 0.05$ LE (V, L1, L2 y L3) vs LE+C (prueba U de Mann-Whitney). ✖ $p < 0.05$ OZDF (V, L1, L2 y L3) vs OZDF+C (prueba U de Mann-Whitney). Abreviaturas: C = control; V = vehículo; L1 = leuprolide 1.25 $\mu\text{g}/\text{rata}$; L2 = leuprolide 2.5 $\mu\text{g}/\text{rata}$; L3 = leuprolide 5 $\mu\text{g}/\text{rata}$.

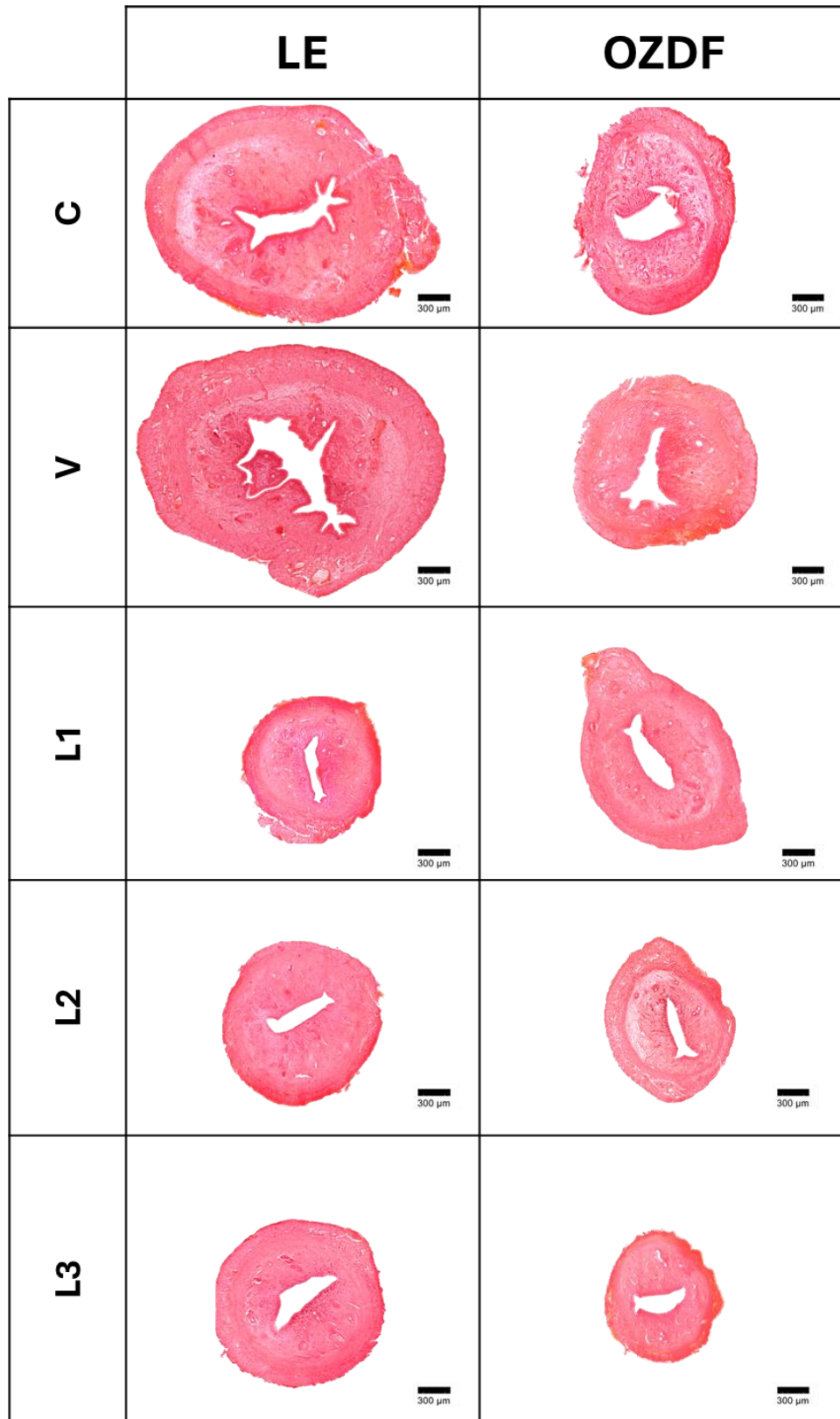


Figura 22. Cortes histológicos de útero representativos de ratas hembra LE y OZDF. Abreviaturas: C = control; V = vehículo; L1 = leuprolide 1.25 µg/rata; L2 = leuprolide 2.5 µg/rata; L3 = leuprolide 5 µg/rata.

Elección de la dosis efectiva

Con el objetivo de determinar la dosis más efectiva de acetato de leuprolide en ratas OZDF, se elaboró una curva concentración-respuesta multiparamétrica (Figura 23) para evaluar el efecto del tratamiento sobre distintos indicadores de la función reproductiva. Esta representación gráfica se diseñó con base en los principios descritos por Feher (2017), quien explica que las curvas concentración-respuesta permiten describir cuantitativamente la relación entre una sustancia bioactiva y el efecto fisiológico que induce en los tejidos blanco.

El gráfico presenta cinco líneas correspondientes a los siguientes parámetros: peso ovárico, masa ovárica, número total de folículos, cuerpos lúteos y folículos sanos. Cada uno fue representado como un cambio porcentual respecto al grupo control normopeso (LE+C), establecido como línea base (0 %). En el eje horizontal se representan las concentraciones administradas de acetato de leuprolide (1, 2.5 y 5 µg/rata), mientras que el eje vertical muestra la variación porcentual en relación con el grupo de referencia.

La representación revela que la dosis de 2.5 µg/rata fue la que mostró los mejores resultados en la preservación de cuerpos lúteos, folículos sanos y folículos totales. Por otro lado, el diámetro uterino y grosor endometrial se redujeron en todas las concentraciones del fármaco evaluadas. En conjunto, estos resultados evidenciaron que el acetato de leuprolide moduló de manera significativa la función reproductiva, particularmente a nivel folicular, siendo la dosis de 2.5 µg/rata la más efectiva para preservar estas estructuras clave (Figura 23).

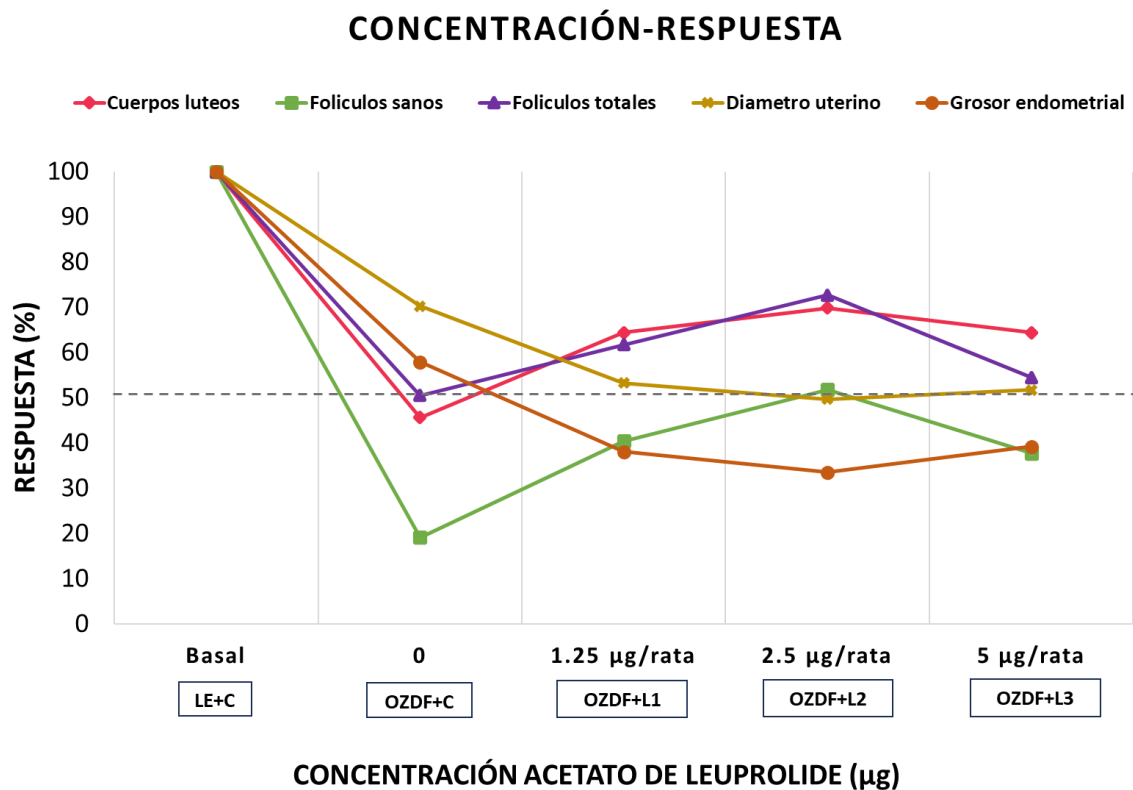


Figura 23. Gráfico concentración-respuesta de la administración de LEU en ratas Zucker obesas adultas.

ADMINISTRACIÓN DE LEU POR 21 DÍAS

Una vez que se seleccionó la dosis efectiva se procedió a realizar los experimentos correspondientes al diseño experimental dos y los resultados se desglosan a continuación.

Parámetros zoométricos

Longitud corporal

El análisis de la longitud nasoanal no mostró diferencias significativas entre los grupos control, vehículo o tratados con acetato de leuprolide, en ninguna de las dos cepas (LE y OZDF) (Tabla 8).

En contraste, la longitud de la cola fue consistentemente menor en las ratas obesas respecto a las normopeso. Por ejemplo, en el grupo control, las ratas LE presentaron una longitud de 19.66 ± 0.21 cm frente a 15.83 ± 0.38 cm en las OZDF ($p = 1.29 \times 10^{-7}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey). Este mismo patrón se mantuvo en los grupos tratados con vehículo y con las tres dosis de LEU, sin que se observaran diferencias significativas entre los grupos obesos tratados entre sí (Tabla 8).

Tabla 8. Longitud corporal administración de LEU por 21 días.

		Longitud nasoanal (cm)	Longitud de la cola (cm)	Longitud total (cm)
DELGADAS	C	22.75 ± 0.38	19.66 ± 0.21	42.1 ± 0.4
	V	22.75 ± 0.21	18.83 ± 0.51	41.58 ± 0.47
	L	22.75 ± 0.17	18.83 ± 0.33	41.25 ± 0.54
OBESAS	C	21.91 ± 0.30	* 15.83 ± 0.38	* 36.65 ± 0.83
	V	22 ± 0.44	* 15.53 ± 0.31	* 36.51 ± 0.52
	L	22.66 ± 0.33	* 16.25 ± 0.28	* 38.5 ± 0.51

Nota: Media \pm E.E. de la longitud nasoanal, longitud de la cola y longitud total (cm) en hembras LE y OZDF en el momento del sacrificio n=6 por grupo (C, V y L) * $p < 0.05$ LE vs OZDF (prueba ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Tukey). Abreviaturas: C = control; V = vehículo; L= leuprolide 2.5 μ g/rata.

Peso corporal

El análisis del peso corporal entre los 76 y 111 días de edad evidenció diferencias consistentes entre cepas en todos los grupos experimentales (Figura 24, A). En el grupo control, las ratas obesas presentaron un peso significativamente mayor que las delgadas desde el inicio de la evaluación, con valores de OZDF+C: 223.66 ± 9.56 g vs LE+C: 182.67 ± 2.57 g; $p = 1.38 \times 10^{-2}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey.

De manera similar, en el grupo vehículo, las ratas obesas mantuvieron un peso superior al de las delgadas durante todo el periodo experimental ($p < 0.05$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey). Finalmente, en el grupo tratado con acetato de leuprolide, las ratas OZDF también conservaron un peso significativamente mayor que las LE en todas las evaluaciones realizadas ($p < 0.05$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey).

Circunferencia abdominal

La circunferencia abdominal fue significativamente mayor en las ratas obesas en comparación con las delgadas en todos los tratamientos evaluados (control, vehículo y LEU) ($p = 3.43 \times 10^{-19}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey). Este patrón se mantuvo de manera constante en ambas cepas, confirmando que la obesidad se asocia con una expansión abdominal marcada, independientemente de la administración de vehículo o de las distintas dosis de LEU (Figura 24, B).

Grasa pélvica y abdominal

El peso de la grasa pélvica y abdominal, evaluado al momento del sacrificio, fue significativamente mayor en las ratas obesas en comparación con las delgadas. En el grupo control, las OZDF alcanzaron 87.71 ± 4.29 g frente a 17.89 ± 1.64 g en las LE ($p = 4.02 \times 10^{-14}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey). Este mismo patrón se mantuvo en los grupos tratados con vehículo y con LEU, donde las ratas obesas presentaron un peso de tejido adiposo superior al de sus contrapartes delgadas ($p = 5.65 \times 10^{-23}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey), lo que confirma una marcada acumulación de grasa asociada al fenotipo obeso (Figura 24, C).

Índice de adiposidad

El índice de adiposidad fue significativamente mayor en las ratas obesas en comparación con las delgadas en todos los tratamientos evaluados (control, vehículo y LEU). En conjunto, los análisis mostraron que las OZDF mantienen un valor de adiposidad elevado frente a las LE de manera consistente, independientemente de la administración de vehículo o de las distintas dosis de acetato de leuprolide ($p = 3.38 \times 10^{-13}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey) (Figura 24, D).

Consumo de alimento

En el grupo control, las ratas obesas presentaron niveles de glucosa significativamente más elevados (OZDF: 89.91 ± 7.21 mg/dL vs LE: 66.82 ± 7.69 mg/dL; $p = 3.51 \times 10^{-2}$; ANOVA de dos vías seguida

de prueba post hoc de Tukey). Una diferencia similar se observó en el grupo vehículo (OZDF: 91.56 ± 9.49 mg/dL vs LE: 70.02 ± 5.35 mg/dL; $p = 3.42 \times 10^{-2}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey).

Tras la administración de LEU, los valores en las OZDF se incrementaron (108.08 ± 16.53 mg/dL), mientras que en las LE se redujeron (54.59 ± 6.13 mg/dL), sin que estas variaciones resultaran estadísticamente significativas en comparación con sus respectivos controles. En conjunto, estos resultados confirman que la obesidad se asocia a niveles elevados de glucosa, y que la administración de LEU no modificó este parámetro de forma significativa en ninguna de las cepas (Figura 25, E).

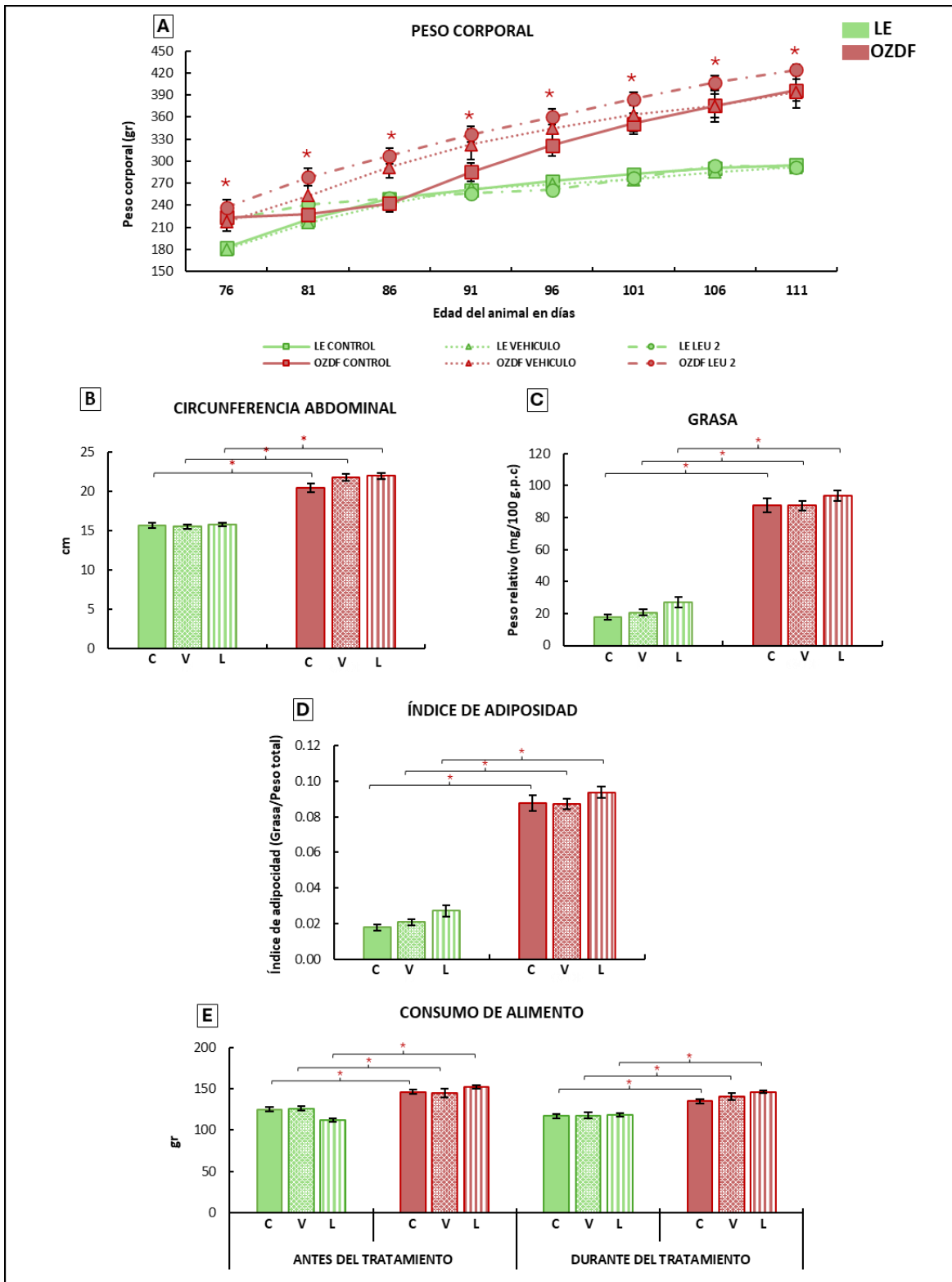


Figura 24. Parámetros zoométricos administración de LEU por 21 días. **A)** Media \pm E.E. del peso corporal (g) de las hembras LE y OZDF. **B)** Media \pm E.E. del promedio de la circunferencia abdominal (cm) de las hembras LE y OZDF. **C)** Media \pm E.E. de peso (mg) de grasa pélvica y abdominal de las hembras LE y OZDF. **D)** Media \pm E.E. del índice de adiposidad de las hembras LE y OZDF. **E)** Media \pm E.E. del consumo de alimento (gr) de las hembras LE y OZDF, n=6 por grupo (C,V y L), *p<0.05 LE vs OZDF (prueba ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Tukey). Abreviaturas: C = control; V = vehículo; L= leuprolide 2.5 μ g/rata.

Perfil metabólico

Glucosa

En el grupo control, las ratas obesas presentaron niveles de glucosa significativamente más elevados (OZDF: 89.91 ± 7.21 mg/dL vs LE: 66.82 ± 7.69 mg/dL; $p = 3.51 \times 10^{-2}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey). Una diferencia similar se observó en el grupo vehículo (OZDF: 91.56 ± 9.49 mg/dL vs LE: 70.02 ± 5.35 mg/dL; $p = 3.42 \times 10^{-2}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey). Tras la administración de LEU, las OZDF alcanzaron valores más altos (108.08 ± 16.53 mg/dL), mientras que las LE mostraron una reducción (54.59 ± 6.13 mg/dL), aunque estas variaciones no resultaron significativas en comparación con sus respectivos controles (Figura 25, A).

Triglicéridos

En condiciones basales, las ratas obesas mostraron niveles significativamente más elevados de triglicéridos en comparación con las delgadas (OZDF: 340.42 ± 13.58 mg/dL vs LE: 180.42 ± 24.40 mg/dL; $p = 1.18 \times 10^{-4}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey). Esta diferencia se mantuvo en el grupo vehículo (OZDF: 310.00 ± 19.45 mg/dL vs LE: 162.08 ± 20.47 mg/dL; $p = 3.53 \times 10^{-4}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey). En los grupos tratados con LEU, las OZDF continuaron presentando valores elevados (272.08 ± 33.55 mg/dL) respecto a las LE (138.33 ± 11.21 mg/dL; $p = 1.25 \times 10^{-3}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey), sin que el tratamiento produjera cambios significativos dentro de cada cepa (Figura 25, B).

Colesterol

El colesterol total también fue consistentemente mayor en las ratas obesas en comparación con las delgadas. En el grupo control, las OZDF alcanzaron 135.56 ± 13.24 mg/dL frente a 43.06 ± 5.37 mg/dL en las LE ($p = 9.07 \times 10^{-7}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey). En el grupo vehículo, se mantuvo la misma tendencia (OZDF: 114.17 ± 11.61 mg/dL vs LE: 37.22 ± 4.33 mg/dL; $p = 2.27 \times 10^{-5}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey).

En los grupos tratados con LEU, las ratas obesas mostraron una reducción significativa de colesterol (OZDF+LEU: 91.67 ± 12.25 mg/dL vs OZDF+C: 135.56 ± 13.24 mg/dL; $p = 1.91 \times 10^{-2}$; ANOVA de una vía seguida de prueba post hoc de Tukey). En contraste, las ratas LE no presentaron cambios relevantes tras el tratamiento con LEU (41.67 ± 4.44 mg/dL vs LE+C: 43.06 ± 5.37 mg/dL) (Figura 25, C).

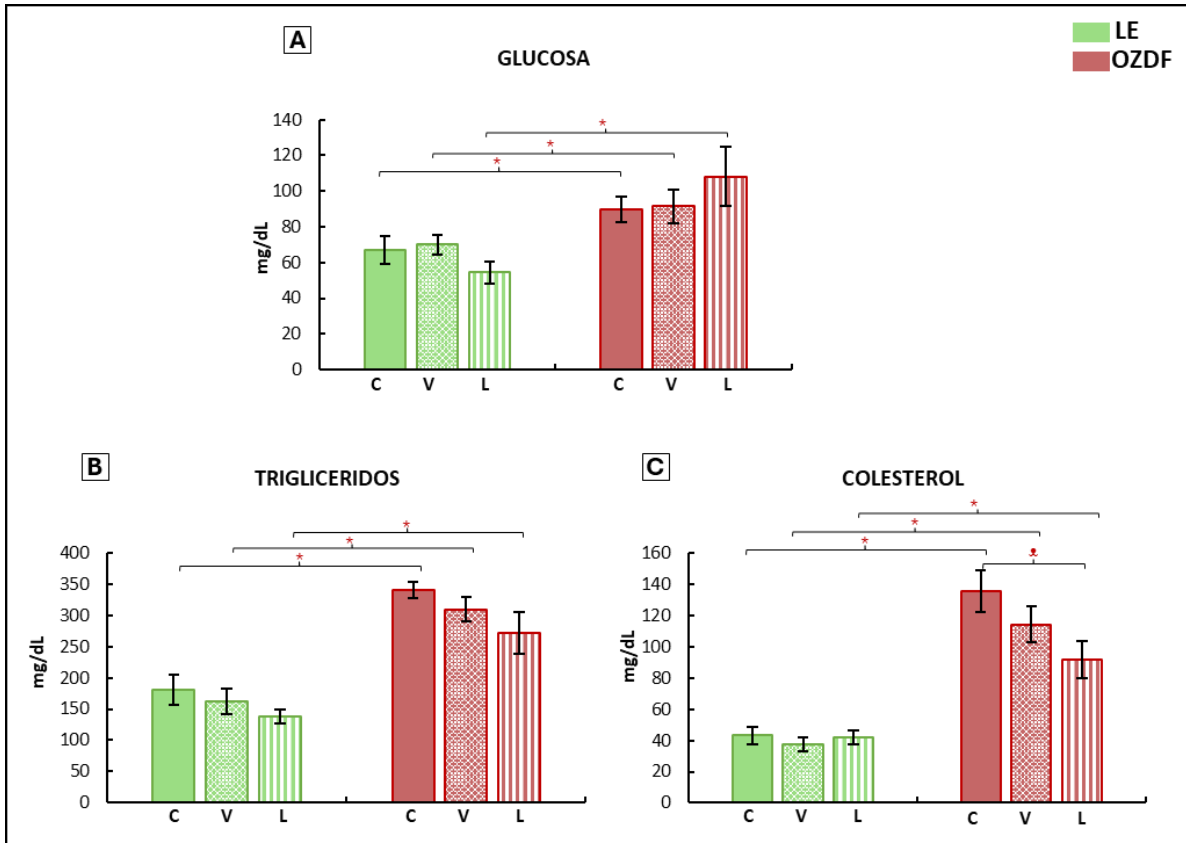


Figura 25. Perfil metabólico administración de LEU por 21 días. **A)** Media \pm E.E. de niveles de glucosa sérica en las hembras LE y OZDF. **B)** Media \pm E.E. de niveles de triglicéridos séricos en las hembras LE y OZDF. **C)** Media \pm E.E. de niveles de colesterol sérico en las hembras LE y OZDF n=6 por grupo (C,V y L), * $p < 0.05$ LE vs OZDF (prueba ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Tukey), ** $p < 0.05$ OZDF+C vs OZDF+L (prueba ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey). Abreviaturas: C = control; V = vehículo; L = leuprolide 2.5 μ g/rata.

Peso relativo de los órganos

El análisis del peso relativo de la hipófisis (H) mostró diferencias significativas entre cepas en los grupos control y vehículo, donde las ratas OZDF presentaron valores menores en comparación con las ratas LE (OZDF+C: 0.0537 ± 0.0091 g y OZDF+V: 0.0549 ± 0.0066 g vs LE+C: 0.1101 ± 0.0113 g y LE+V: 0.1242 ± 0.0113 g; $p = 8.69 \times 10^{-8}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey).

Tras la administración de LEU, se observó un incremento significativo en el peso hipofisario de las ratas obesas en comparación con su grupo control (OZDF+LEU: 0.0930 ± 0.0071 g vs OZDF+C: 0.0537 ± 0.0091 g; $p = 2.97 \times 10^{-2}$; ANOVA de una vía seguida de prueba post hoc de Tukey). En contraste, las ratas LE no mostraron cambios relevantes tras el tratamiento (LE+LEU: 0.1213 ± 0.0071 g vs LE+C: 0.1101 ± 0.0113 g) (Figura 26, A).

En relación con las glándulas adrenales derecha (AD) e izquierda (AI), no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales. En las ratas LE, los valores oscilaron entre 0.1018 ± 0.0032 g (control), 0.1010 ± 0.0033 g (vehículo) y 0.0826 ± 0.0048 g (LEU) en AD, y entre 0.0986 ± 0.0026 g (control), 0.0990 ± 0.0087 g (vehículo) y 0.0860 ± 0.0040 g (LEU) en AI. En las ratas OZDF, los valores fueron de 0.0757 ± 0.0060 g (control), 0.0750 ± 0.0101 g (vehículo) y 0.0788 ± 0.0091 g (LEU) para AD, y de 0.0808 ± 0.0098 g (control), 0.0881 ± 0.0048 g (vehículo) y 0.0781 ± 0.0079 g (LEU) para AI.

Aunque en ambas glándulas los valores tendieron a ser menores en las ratas obesas respecto a las delgadas, estas diferencias no alcanzaron significancia estadística (Figura 26 B–C).

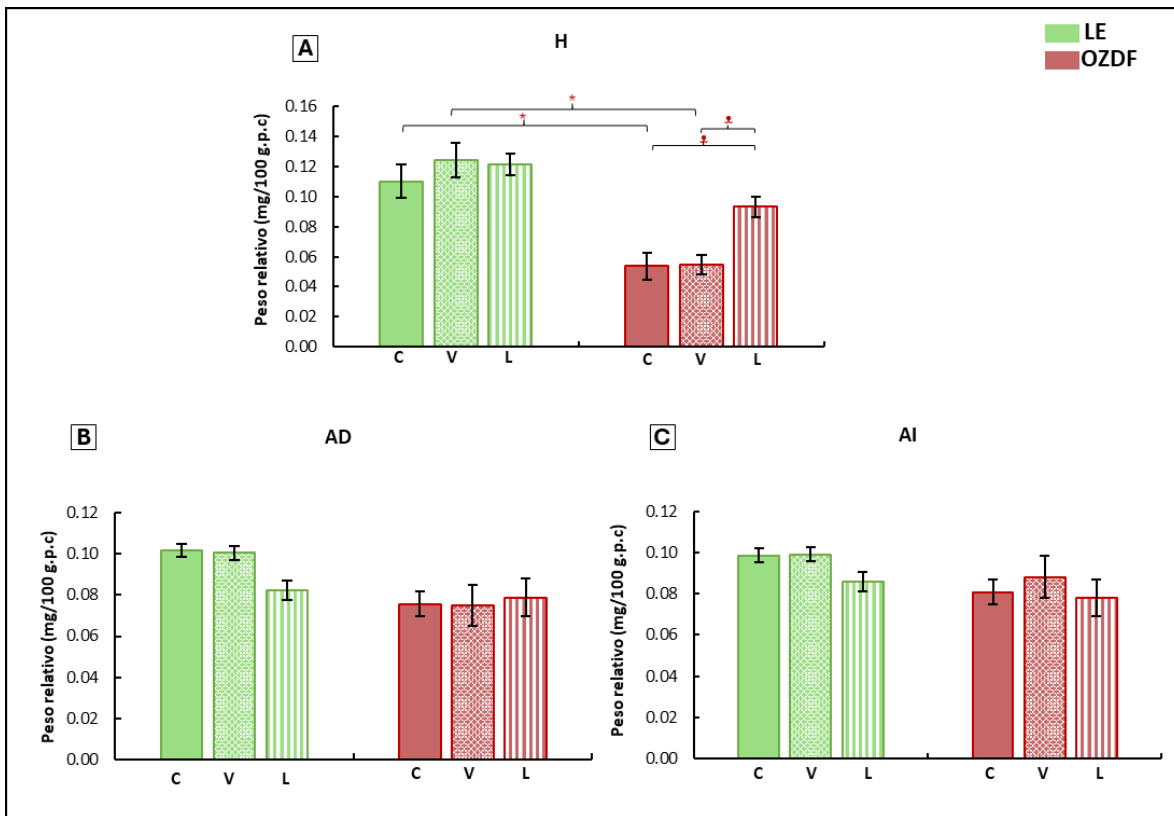


Figura 26. Peso relativo de órganos administración de LEU por 21 días. **A)** Media \pm E.E. del peso (mg) de la hipófisis (H) de las hembras LE y OZDF. **B)** Media \pm E.E. del peso (mg) de la glándula adrenal derecha (AD) de las hembras LE y OZDF. **C)** Media \pm E.E. del peso (mg) de la glándula adrenal izquierda (AI) de las hembras LE y OZDF, n=6 por grupo (C, V y L) * $p < 0.05$ LE vs OZDF (prueba ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Tukey), $\bullet p < 0.05$ OZDF+C vs OZDF+L (prueba ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey). Abreviaturas: C = control; V = vehículo; L= leuprolide 2.5 μ g/rata.

Parámetros reproductivos

Peso relativo de órganos reproductivos

El peso relativo del ovario derecho (OD) fue significativamente menor en las ratas obesas en comparación con las delgadas en el grupo control (OZDF+C: 0.0558 ± 0.0080 g vs LE+C: 0.1152 ± 0.0052 g; $p = 7.03 \times 10^{-6}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey). Una tendencia similar se observó en el grupo vehículo (OZDF+V: 0.0684 ± 0.0074 g vs LE+V: 0.1129 ± 0.0049 g; $p = 5.12 \times 10^{-4}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey). Tras la administración de LEU, las ratas obesas mostraron un incremento significativo en el peso del OD en comparación con su grupo control y vehículo (OZDF+LEU: 0.0916 ± 0.0089 g vs OZDF+C: 0.0558 ± 0.0080 g; $p = 5.96 \times 10^{-3}$ y vs OZDF+V: 0.0684 ± 0.0074 g; $p = 1.29 \times 10^{-2}$; ANOVA de una vía seguida de prueba post hoc de Tukey), mientras que en las ratas delgadas los valores se mantuvieron estables (LE+LEU: 0.1175 ± 0.0047 g vs LE+C: 0.1152 ± 0.0052 g) (Figura 27, A).

El análisis del ovario izquierdo (OI) mostró un patrón comparable. En los grupos control y vehículo, las ratas OZDF presentaron valores significativamente menores frente a las delgadas (OZDF+C: 0.0537 ± 0.0091 g vs LE+C: 0.1101 ± 0.0113 g; $p = 9.28 \times 10^{-4}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey y OZDF+V: 0.0549 ± 0.0066 g vs LE+V: 0.1242 ± 0.0113 g; $p = 6.05 \times 10^{-5}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey). Tras el tratamiento, se registró un incremento significativo en el OI de las ratas obesas en comparación con sus grupos control y vehículo (OZDF+LEU: 0.0930 ± 0.0071 g vs OZDF+C: 0.0537 ± 0.0091 g; $p = 2.97 \times 10^{-2}$ y vs OZDF+V: 0.0549 ± 0.0066 g; $p = 3.91 \times 10^{-2}$; ANOVA de una vía seguida de prueba post hoc de Tukey). En las ratas delgadas, los valores permanecieron sin diferencias relevantes respecto a sus controles (LE+LEU: 0.1213 ± 0.0070 g vs LE+C: 0.1101 ± 0.0113 g) (Figura 27, B).

El análisis de la masa ovárica total confirmó que en los grupos control y vehículo las ratas obesas presentaron valores significativamente menores respecto a las delgadas (OZDF+C: 0.11 ± 0.02 g vs LE+C: 0.23 ± 0.02 g; $p = 2.14 \times 10^{-5}$ y OZDF+V: 0.12 ± 0.01 g vs LE+V: 0.24 ± 0.01 g; $p = 3.03 \times 10^{-5}$; ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey). Tras la administración de LEU, se observó un incremento significativo en la masa ovárica de las ratas obesas en comparación con sus grupos control y vehículo (OZDF+LEU: 0.18 ± 0.02 g vs OZDF+C: 0.11 ± 0.02 g; $p = 5.90 \times 10^{-3}$ y vs OZDF+V: 0.12 ± 0.01 g; $p = 3.45 \times 10^{-2}$; ANOVA de una vía seguida de prueba post hoc de Tukey), mientras que en las ratas delgadas los valores se mantuvieron estables (LE+LEU: 0.24 ± 0.01 g vs LE+C: 0.23 ± 0.02 g) (Figura 27, C).

El análisis del peso relativo del útero mostró valores significativamente menores en las ratas obesas en comparación con las delgadas en los grupos control y vehículo. En el grupo control, las OZDF presentaron un peso uterino de 0.729 ± 0.146 g frente a 1.586 ± 0.064 g en las LE ($p = 2.005 \times 10^{-5}$, prueba ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey). En el grupo vehículo, se mantuvo la misma tendencia, con valores de 0.752 ± 0.135 g en OZDF frente a 1.716 ± 0.137 g en LE ($p = 2.691 \times 10^{-6}$, prueba ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc de Tukey).

Tras la administración de acetato de leuprolide, se observó una reducción drástica en el peso uterino en ambas cepas respecto a sus controles. En las ratas obesas, el valor disminuyó a 0.403 ± 0.013 g frente a 0.729 ± 0.146 g en el grupo obeso control ($p = 0.0148$, prueba ANOVA de una vía seguida de prueba post hoc de Tukey). De manera similar, en las ratas delgadas tratadas con LEU, el útero se redujo a 0.597 ± 0.042 g respecto a 1.586 ± 0.064 g en el control delgado ($p = 1.669 \times 10^{-6}$ prueba ANOVA de una vía seguida de prueba post hoc de Tukey) (Figura 27, D).

En conjunto, estos hallazgos confirman que el fenotipo obeso se asocia con un útero de menor peso y que el tratamiento con acetato de leuprolide potencia esta reducción tanto en ratas obesas como en delgadas.

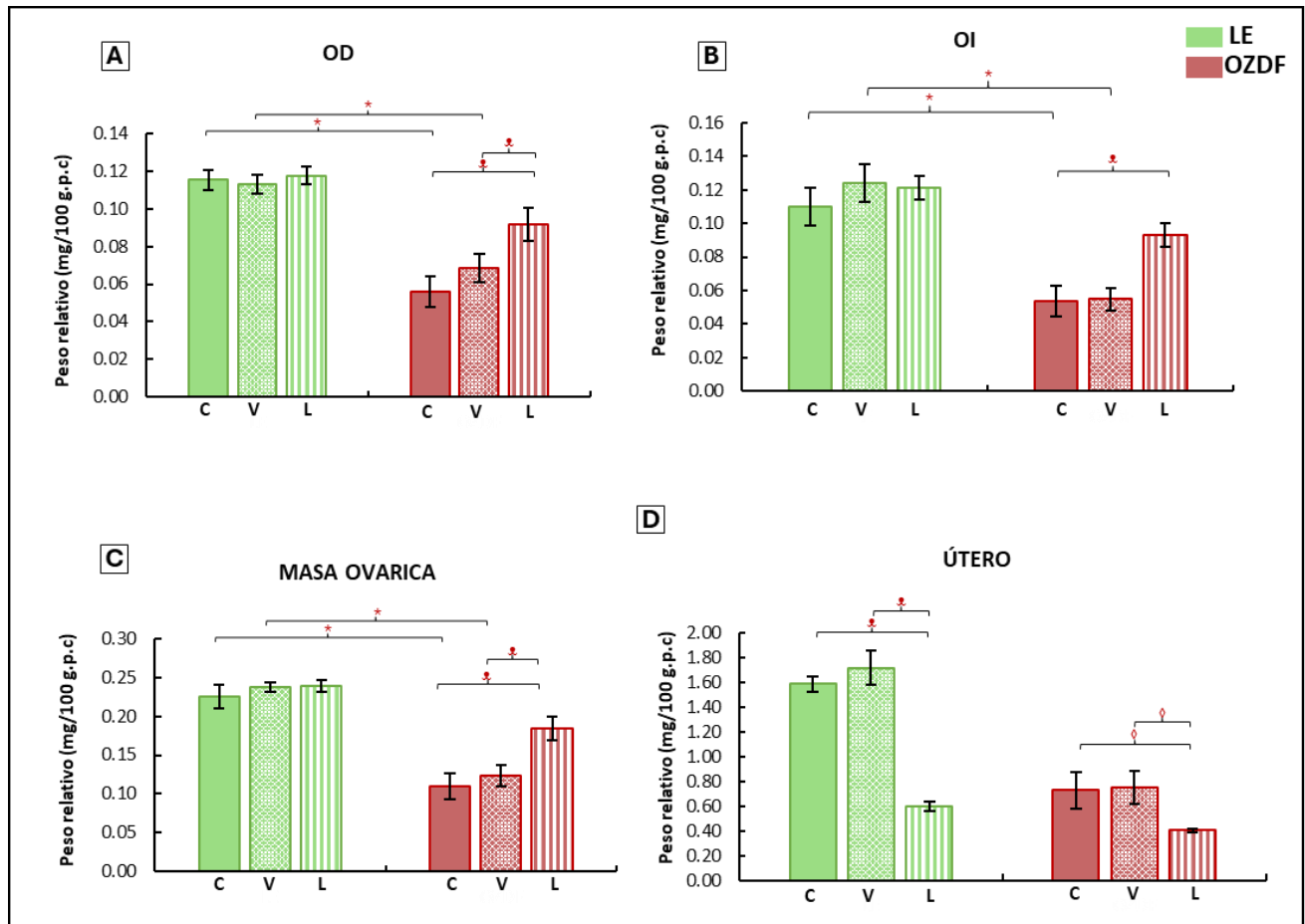


Figura 27. Peso de órganos reproductivos administración de LEU por 21 días. **A)** Media \pm E.E. del peso (mg) del ovario derecho (OD) de las hembras LE y OZDF. **B)** Media \pm E.E. del peso (mg) del ovario izquierdo (OI) de las hembras LE y OZDF. **C)** Media \pm E.E. de masa ovárica (mg) de las hembras LE y OZDF, $n=6$ por grupo (control, vehículo y LEU), * $p<0.05$ LE vs OZDF (prueba ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Tukey), ♦ $p<0.05$ OZDF+C vs OZDF+L (prueba ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey). **D)** Media \pm E.E. del peso (mg) uterino de las hembras LE y OZDF $n=6$ por grupo (C,V y L), ♦ $p<0.05$ LE+C y LE+V vs LE+L (prueba ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey) ♦ $p<0.05$ OZDF+C y OZDF+V vs OZDF+L (prueba ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey). Abreviaturas: C = control; V = vehículo; L= leuprolide 2.5 μ g/rata.

Monitoreo del ciclo estral

El análisis de los frotis vaginales obtenidos durante tres ciclos previos a la administración de LEU (12 días) mostró que las ratas OZDF presentaron ciclos estrales irregulares en comparación con las ratas LE. Además, la incidencia de la fase de diestro fue mayor en las ratas obesas respecto a las normopeso, lo que indica una alteración en la dinámica del ciclo estral asociada al fenotipo obeso (Figuras 28, 29 y 30).

Durante los tres ciclos de evaluación bajo tratamiento con LEU (12 días), se mantuvo la irregularidad en los ciclos estrales de las ratas OZDF, mientras que en las LE el patrón mostró modificaciones dependientes del tratamiento. En los grupos control y vehículo de ambas cepas se conservaron las diferencias previamente descritas (con mayor prevalencia de diestro en OZDF respecto a LE). Sin embargo, en las ratas LE tratadas con LEU se observó un aumento en la duración de la fase de diestro, acompañado de una disminución en la incidencia de proestro y estro. Por el contrario, en las ratas OZDF el tratamiento con LEU produjo un descenso en la frecuencia de diestros y un aumento en la presencia de proestro y estro en comparación con sus grupos control y vehículo (Figuras 28, 29 y 30).

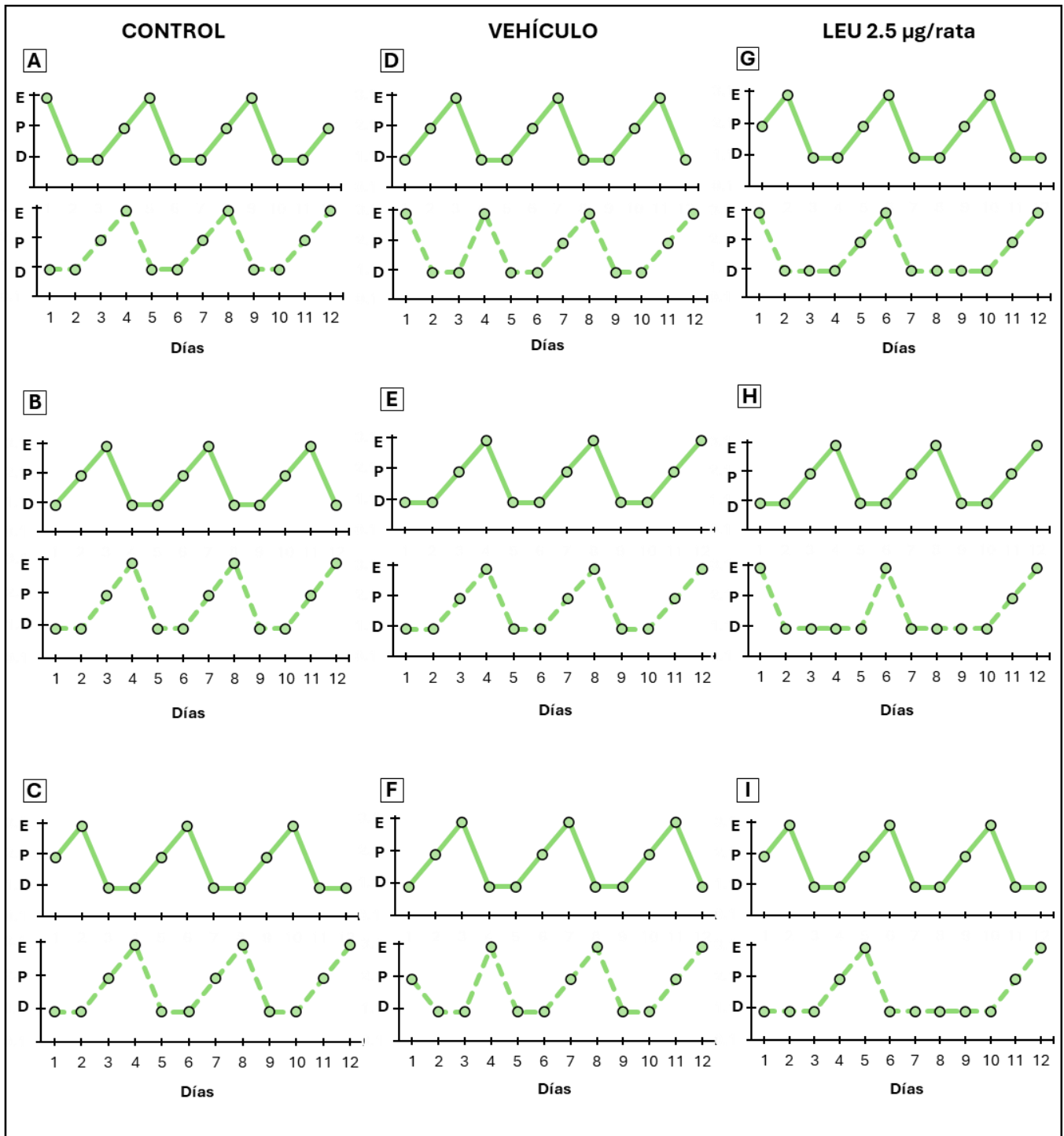


Figura 28. Registro del ciclo estral en ratas Long Evans pertenecientes a tres grupos experimentales, cada uno conformado por tres animales: control (A–C), vehículo (D–F) y administración de leuprolide (G–I). Se presentan los patrones del ciclo estral obtenidos mediante citología vaginal diaria durante dos periodos consecutivos: 12 días previos al tratamiento (líneas rectas) y 12 días durante el tratamiento (líneas punteadas). En el eje vertical se representan las fases del ciclo: estró (E), proestro (P) y diestro 1 y 2 (D), mientras que en el eje horizontal se indican los días de evaluación.

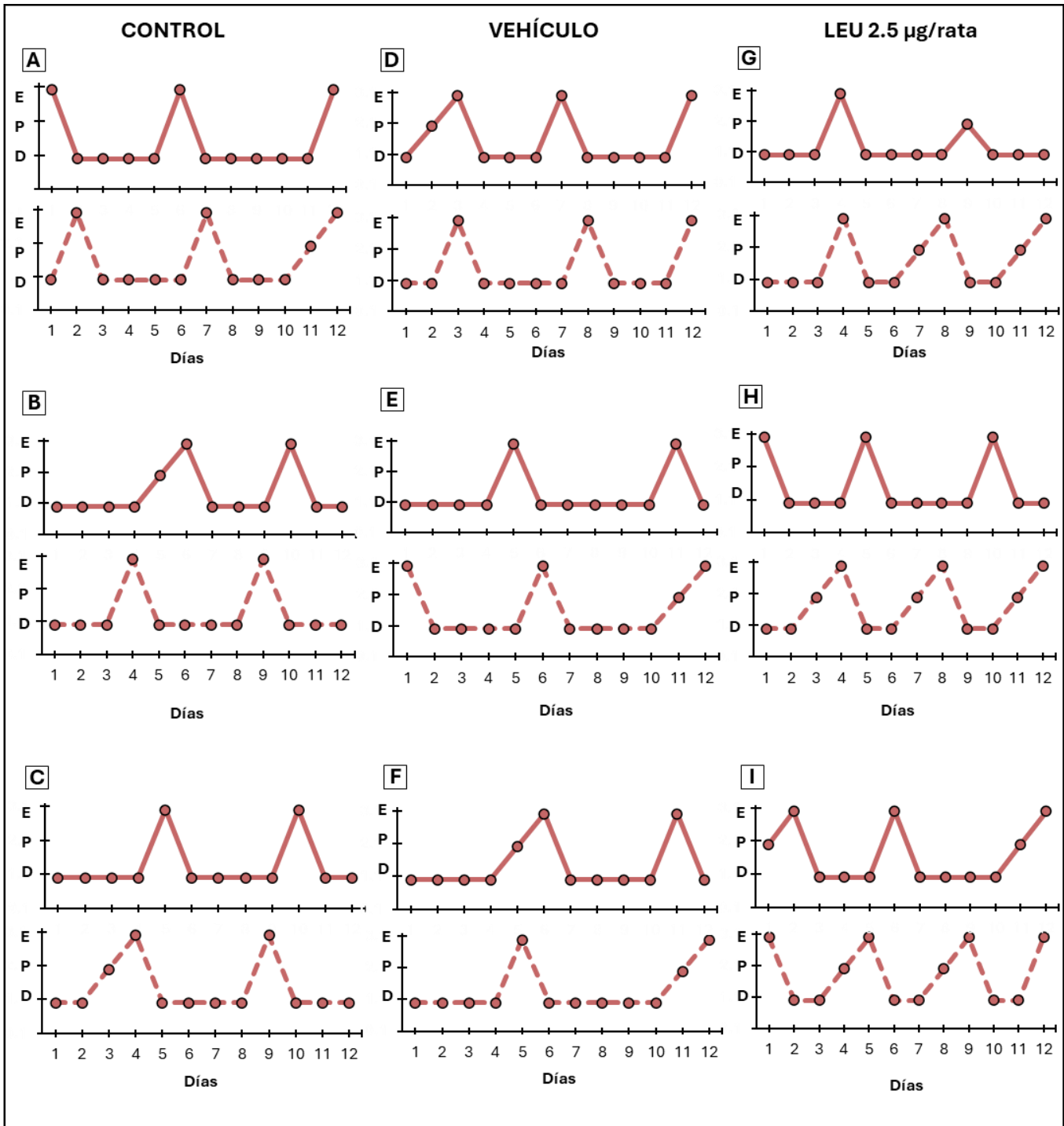


Figura 29. Registro del ciclo estral en ratas Zucker obesas pertenecientes a tres grupos experimentales, cada uno conformado por tres animales: control (A–C), vehículo (D–F) y administración de leuprolide (G–I). Se presentan los patrones del ciclo estral obtenidos mediante citología vaginal diaria durante dos periodos consecutivos: 12 días previos al tratamiento (líneas rectas) y 12 días durante el tratamiento (líneas punteadas). En el eje vertical se representan las fases del ciclo: estró (E), proestro (P) y diestro 1 y 2 (D), mientras que en el eje horizontal se indican los días de evaluación.

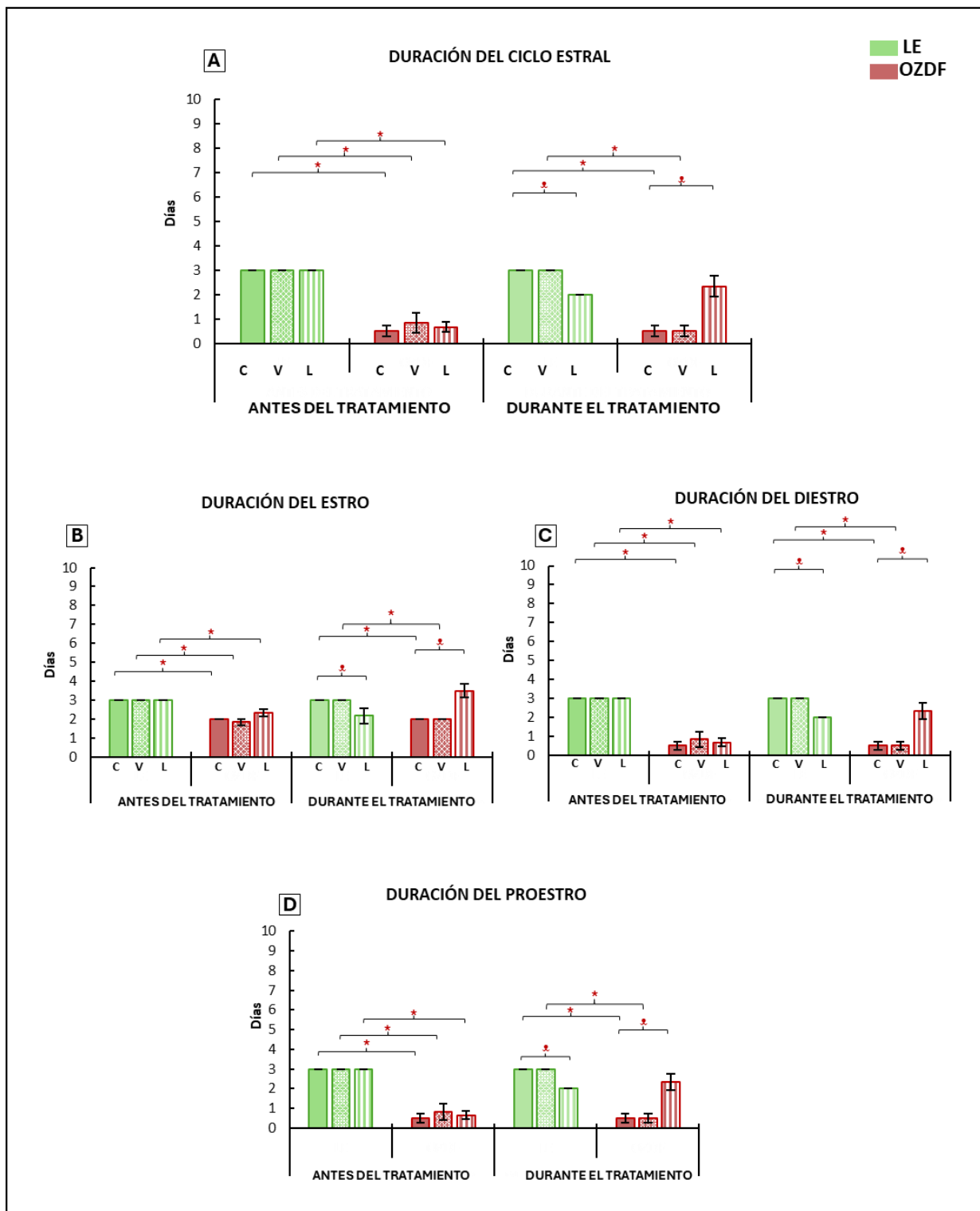


Figura 30. Media \pm E.E de la duración de las fases del ciclo estral, 12 días antes y 12 días durante el tratamiento de administración de LEU por 21 días. **A)** Media \pm E.E. de la duración total del ciclo estral en hembras LE y OZDF. **B)** Media \pm E.E. de la duración de la etapa de estro en hembras LE y OZDF. **C)** Media \pm E.E. de la duración de la etapa de diestro 1 y 2 en hembras LE y OZDF. **D)** Media \pm E.E. de la duración de la etapa de proestro en hembras LE y OZDF, n=6 por grupo (control, vehículo y LEU), *p<0.05 LE vs OZDF (prueba ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Tukey), *p<0.05 OZDF+C vs OZDF+L y 05 LE+C y LE+ C vs LE+L (prueba ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey). Abreviaturas: C = control; V = vehículo; L= leuprolide 2.5 μ g/rata.

Análisis histológico de tejidos reproductivos

Ovarios

Se realizó un análisis histológico en ambos ovarios de cada animal para evaluar parámetros relacionados con la función ovárica: el conteo de cuerpos lúteos como indicativo de ovulación, presencia de quistes y la población folicular, clasificada en folículos sanos, atrésicos y totales así como el análisis de desarrollo folicular (Tabla 9 y Figura 31).

Cuerpos lúteos

Las ratas obesas presentaron un menor número de cuerpos lúteos en comparación con las ratas normopeso, lo que indica una disminución en la capacidad ovulatoria (OZDF+C: 5.66 ± 0.49 vs LE+C: 11.5 ± 0.5 ; $p = 4.775 \times 10^{-7}$, prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc Dunn). En las ratas obesas, la administración de LEU incrementó significativamente el número de cuerpos lúteos, (OZDF+L: 12.8 ± 0.79 vs OZDF+C: 5.66 ± 0.49 ; $p = 6.828 \times 10^{-9}$, prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc Dunn) (Tabla 9, A).

Quistes

El análisis histológico mostró una mayor presencia de quistes en los ovarios de las ratas obesas en comparación con las normopeso ($p = 2.117 \times 10^{-5}$ prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc Dunn) (Tabla 9, B).

En el grupo control, las OZDF presentaron 6.33 ± 0.49 quistes frente a 1 ± 0.44 en LE ($p = 5.118 \times 10^{-6}$ prueba prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc Dunn). En el grupo vehículo, la diferencia se mantuvo (OZDF+V: 6.83 ± 0.47 vs LE+V: 0.83 ± 0.83 ; $p = 5.933 \times 10^{-7}$ prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc Dunn).

Tras la administración de LEU, en las ratas LE se observó un incremento significativo en el número de quistes respecto a su control (LE+L: 8.83 ± 0.76 vs LE+C: 1 ± 0.44 ; $p = 9.786 \times 10^{-9}$ prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc Dunn). Por el contrario, en las ratas OZDF tratadas con LEU se registró una reducción significativa en comparación con el grupo control obeso (OZDF+L: 4.33 ± 0.42 vs OZDF+C: 6.33 ± 0.49 ; $p = 0.04248$ prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc Dunn).

Población folicular

Folículos sanos

Las ratas obesas presentaron un número significativamente menor de folículos sanos en comparación con las delgadas (OZDF+C 114.16 ± 19.85 vs LE+C 350.33 ± 35.32 ; $p = 0.003101$, prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc de Dunn). Tras la administración de LEU, se observó un incremento significativo en las OZDF (OZDF+L 400.33 ± 28.78 vs OZDF+C 114.16 ± 19.85 ; $p = 0.0003048$, prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc de Dunn), lo que sugiere un efecto positivo sobre la población folicular sana en esta cepa. En contraste, en las ratas

normopeso la administración de LEU redujo significativamente el número de folículos sanos (LE+L 156.83 ± 26.99 vs LE+C 350.33 ± 35.32 ; $p = 0.01989$, prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc de Dunn) (Tabla 9, C).

Folículos atrésicos

Las ratas OZDF mostraron un número significativamente mayor de folículos atrésicos en comparación con las LE (OZDF+C 133.33 ± 35.92 vs LE+C 9.5 ± 2.24 ; $p = 0.000191$, prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc de Dunn). El tratamiento con LEU redujo la presencia de folículos atrésicos en ratas obesas respecto a su control (OZDF+L 29.33 ± 6.59 vs OZDF+C 133.33 ± 35.92 ; $p = 0.001755$, prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc de Dunn). En contraste, en las LE se observó un incremento en la atresia folicular tras la administración de LEU (LE+L 160.33 ± 17.62 vs LE+C 9.5 ± 2.24 ; $p = 8.989 \times 10^{-6}$, prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc de Dunn) (Tabla 9, C).

Folículos totales

La población folicular total fue significativamente menor en las ratas obesas respecto a las delgadas (OZDF+C 247.5 ± 48.75 vs LE+C 401.5 ± 21.96 ; $p = 0.003885$, prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc de Dunn). En las OZDF tratadas con LEU se observó un incremento en el número de folículos totales (OZDF+L 429.66 ± 32.50 vs OZDF+C 247.5 ± 48.75 $p = 0.01041$, prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc de Dunn). En las LE, la administración de LEU no modificó de forma significativa el número de folículos totales respecto a su control (LE+L 317.16 ± 42.85 vs LE+C 401.5 ± 21.96) (Tabla 9, C).

Desarrollo folicular

El análisis del desarrollo folicular mostró que las ratas normopeso de los grupos control presentaron una mayor cantidad de folículos en desarrollo (LE+C 195.66 ± 10.37 vs OZDF+C 120.5 ± 24.26 ; $p = 0.03737$, prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc de Dunn) y antrales (LE+C 45 ± 1.23 vs OZDF+C 25.83 ± 6.24 ; $p = 0.01027$, prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc de Dunn) en comparación con las ratas obesas de los mismos grupos (Tabla 9, D).

En ratas OZDF, el tratamiento con LEU incrementó significativamente la población de folículos en desarrollo, antrales y preovulatorios respecto al grupo obeso control. Por ejemplo, se registraron 205 ± 19.51 folículos en desarrollo en comparación con 120.5 ± 24.26 en el grupo control ($p = 0.03948$, prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc de Dunn), mientras que el número de folículos antrales aumentó de 25.83 ± 6.24 en OZDF+C a 43.83 ± 4.20 en OZDF+L ($p = 0.01959$, prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc de Dunn). Asimismo, el número de folículos preovulatorios se incrementó significativamente en las OZDF tratadas con LEU en relación con sus controles (OZDF+L 9.83 ± 1.30 vs OZDF+C 5.5 ± 1.72 ; $p = 1.341 \times 10^{-7}$, prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc de Dunn). En las ratas LE la administración de LEU no afectó el número de folículos en desarrollo, antrales ni preovulatorios (Tabla 9, D).

Tabla 9. Análisis histológico de ovarios administración de LEU por 21 días.

A					B				
PRESENCIA DE CUERPOS LÚTEOS					PRESENCIA DE QUISTES				
		LE		OZDF			LE		OZDF
TRATAMIENTO		MEDIA ± E.E.		MEDIA ± E.E.	TRATAMIENTO		MEDIA ± E.E.		MEDIA ± E.E.
C		11.5 ± 0.5		*5.66 ± 0.49	C		1 ± 0.44		*6.33 ± 0.49
V		11 ± 0.68		*5.5 ± 0.22	V		0.83 ± 0.83		*6.83 ± 0.47
L		11.16 ± 0.40		↓12.8 ± 0.79	L		*8.33 ± 0.76		↓4.33 ± 0.42

C					D				
POBLACIÓN FOLICULAR					DESARROLLO FOLICULAR				
		Folículos sanos	Folículos atrésicos	Folículos totales			En desarrollo (<400 µm)	Antrales (400-500 µm)	Preovulatorios (>500 µm)
DELGADAS	C	350.33 ± 35.32	9.5 ± 2.24	401.5 ± 21.96	DELGADAS	C	196.66 ± 10.37	45 ± 1.23	5.5 ± 1.72
	V	335 ± 83.02	11.16 ± 4.15	346.16 ± 85.08		V	170.16 ± 41.55	33.16 ± 6.94	4.33 ± 1.97
	L	*156.83 ± 26.99	*160.33 ± 17.62	317.16 ± 42.85		L	152.5 ± 21.01	34.16 ± 4.36	5.16 ± 0.79
OBESAS	C	*114.16 ± 19.85	*133.33 ± 35.92	*247.5 ± 48.75	OBESAS	C	*120.5 ± 24.26	*25.83 ± 6.57	4.33 ± 1.11
	V	*117.5 ± 16.32	*153.16 ± 12.05	*258 ± 20.09		V	*126.5 ± 9.67	*25.33 ± 6.24	4.16 ± 1.04
	L	↓400.33 ± 28.78	↓*29.33 ± 6.59	↓429.66 ± 32.50		L	↓205 ± 19.51	↓43.83 ± 4.20	↓*9.83 ± 1.30

Nota: **A)** Presencia de cuerpos lúteos en ratas hembra LE y OZDF. **B)** Presencia de quistes en ratas hembra LE y OZDF. **C)** Media ± E.E. de la población folicular de folículos sanos, atrésicos y totales presentes en ambos ovarios en hembras LE y OZDF. **D)** Media ± E.E. del desarrollo folicular presente en ambos ovarios en hembras LE y OZDF, n=6 por grupo (C, V y L) *p<0.05 LE+C vs LE+V, LE+L, OZDF+C, OZDF+V y OZDF+L (prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc Dunn), ↓p<0.05 OZDF+C vs OZDF+V y OZDF+L (prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc Dunn). Abreviaturas: C = control; V = vehículo; L= leuprolide 2.5 µg/rata.

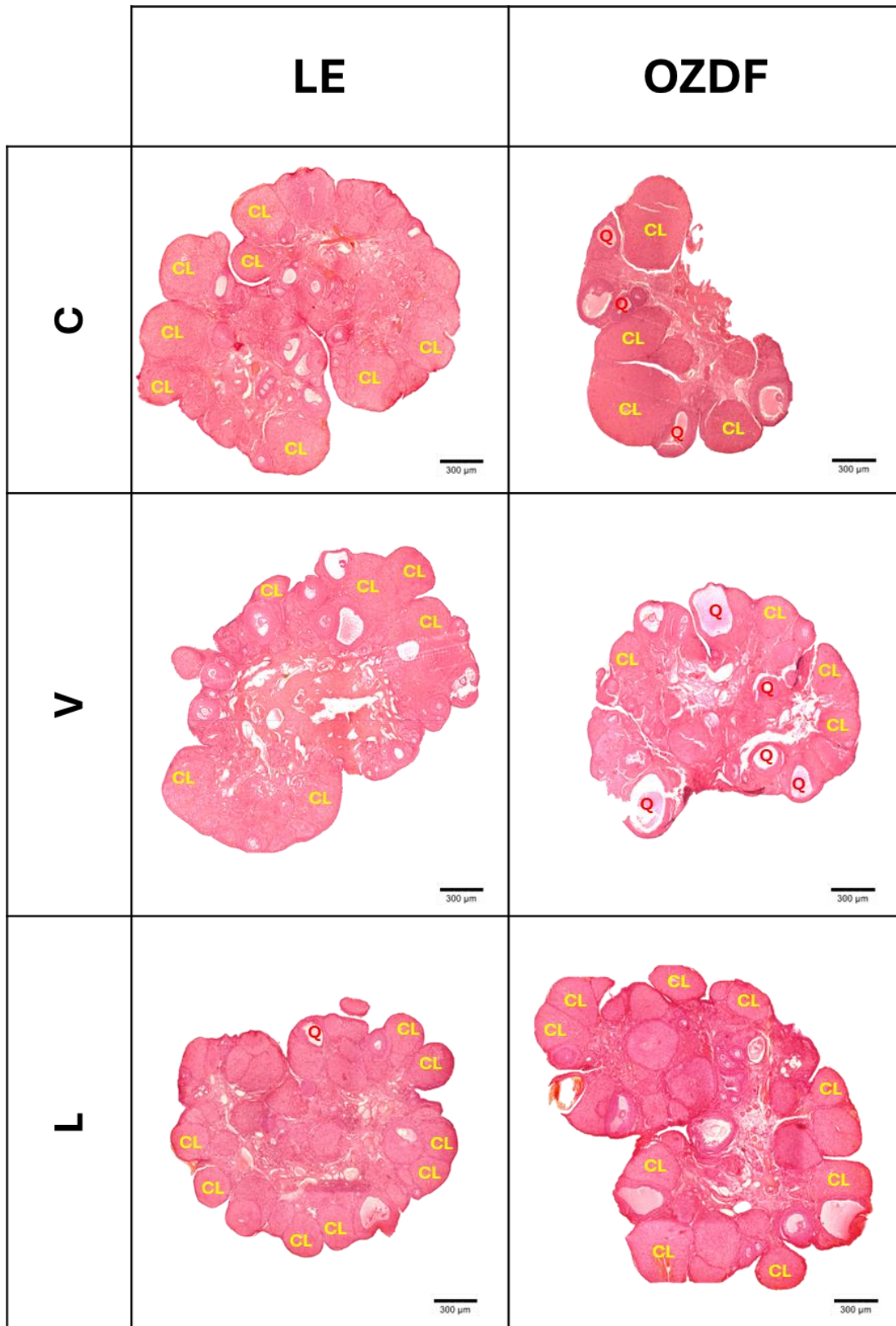


Figura 31. Cortes histológicos de ovario representativos de ratas hembra LE y OZDF, administración de LEU por 21 días (CL: cuerpo lúteo, Q: quiste). Abreviaturas: C = control; V = vehículo; L= leuprolide 2.5 µg/rata.

Útero

Se realizó un análisis histológico del cuerno uterino izquierdo de cada animal, evaluando el diámetro uterino y el grosor endometrial como indicadores de la funcionalidad uterina.

Diámetro uterino

Las ratas obesas presentaron un diámetro uterino significativamente menor en comparación con las ratas normopeso (OZDF+C $990.44 \pm 77.71 \mu\text{m}$ vs LE+C $1318.12 \pm 42.64 \mu\text{m}$; $p = 0.001414$, prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc Dunn). La administración de LEU redujo aún más este parámetro en ambas cepas. En las ratas normopeso, el diámetro disminuyó de $1318.12 \pm 42.64 \mu\text{m}$ en LE+C a $600.62 \pm 38.08 \mu\text{m}$ en LE+L ($p = 1.679 \times 10^{-9}$, prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc Dunn). De forma similar, en las obesas el diámetro se redujo de $990.44 \pm 77.71 \mu\text{m}$ en OZDF+C a $745.81 \pm 13.23 \mu\text{m}$ en OZDF+L ($p = 0.02383$, prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc Dunn) (Tabla 10 y Figura 32).

Grosor endometrial

El grosor endometrial fue consistentemente menor en las ratas obesas respecto a las normopeso (OZDF+C $146.99 \pm 22.37 \mu\text{m}$ vs LE+C $207.88 \pm 8.21 \mu\text{m}$; $p = 0.02844$, prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc Dunn). La administración de LEU disminuyó de forma significativa el grosor endometrial en las ratas delgadas (LE+L $116.70 \pm 6.91 \mu\text{m}$ vs LE+C $207.88 \pm 8.21 \mu\text{m}$; $p = 4.768 \times 10^{-4}$, prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc Dunn), mientras que en las obesas, aunque se observó una reducción (OZDF+L $151.40 \pm 3.09 \mu\text{m}$ vs OZDF+C 146.99 ± 22.37), esta diferencia no alcanzó significancia estadística (Tabla 10 y Figura 32).

Tabla 10. Diámetro uterino y grosor endometrial, administración de LEU por 21 días.

	LE			OZDF		
	C	V	L	C	V	L
Diámetro uterino (μm)	1318.12 ± 42.64	1387.70 ± 72.45	* 600.62 ± 38.08	* 990.44 ± 77.71	* 968.19 ± 50.96	* 745.81 ± 13.23
Grosor endometrial (μm)	207.88 ± 8.21	199.17 ± 13.01	* 116.70 ± 6.91	* 146.99 ± 22.37	* 160.60 ± 18.17	* 151.40 ± 3.09

Nota: Ratas hembra LE y OZDF n=6 por grupo (control, vehículo y LEU 2) * $p < 0.05$ LE+C vs LE+V, LE+L, OZDF+C, OZDF+V y OZDF+L (prueba Kruskal Wallis seguida de una prueba post hoc Dunn), * $p < 0.05$ OZDF+C vs OZDF+V y OZDF+L (prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc Dunn). Abreviaturas: C = control; V = vehículo; L= leuprolide $2.5 \mu\text{g}/\text{rata}$.

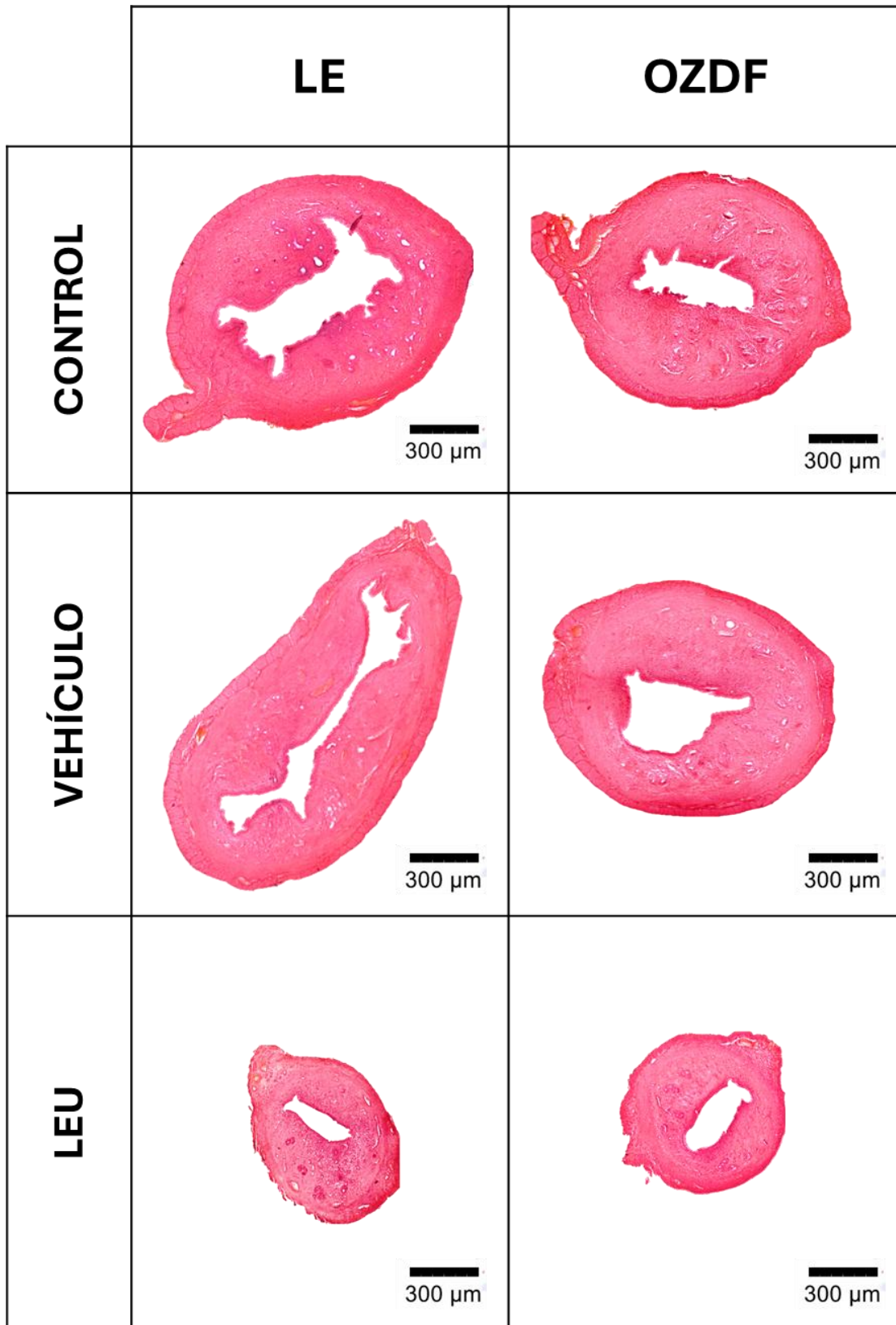


Figura 32. Cortes histológicos de útero representativos, administración de LEU por 21 días, de ratas hembra LE y OZDF. Abreviaturas: C = control; V = vehículo; L= leuprolide 2.5 µg/rata.

RESUMEN DE RESULTADOS PRINCIPALES

1. Determinación de la dosis efectiva de LEU (Experimento 1):

La dosis de 2.5 µg/rata de LEU fue la más efectiva para mejorar los parámetros reproductivos, especialmente en las ratas obesas. Esta dosis incrementó significativamente el número de cuerpos lúteos, folículos sanos y folículos totales, además de favorecer el desarrollo folicular en dicha cepa. Asimismo, el tratamiento redujo el peso y el diámetro uterino, así como el grosor endometrial en ambas cepas.

2. Efectos de la administración de LEU durante 21 días (Experimento 2):

2.1 Parámetros zoométricos y consumo alimentario:

Durante la administración prolongada de LEU, las ratas obesas conservaron mayores valores de peso corporal, circunferencia abdominal, grasa pélvica y abdominal, e índice de adiposidad en comparación con las ratas normopeso, independientemente del tratamiento recibido. LEU no fue capaz de reducir el peso corporal ni modificar el consumo alimentario en ninguno de los grupos.

2.2 Perfil metabólico:

Las ratas obesas mostraron mayores niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol frente a las normopeso. La administración de LEU no produjo cambios significativos en los niveles de glucosa ni de triglicéridos; sin embargo, logró reducir significativamente los niveles de colesterol en las ratas obesas ($p < 0.05$).

2.3 Peso relativo de órganos:

Se observó que LEU incrementó el peso de la hipófisis en las ratas obesas, mientras que el peso de las glándulas adrenales no presentó modificaciones significativas con el tratamiento, en ninguna de las cepas evaluadas.

3. Función reproductiva y análisis histológico:

3.1 Peso de órganos reproductivos:

LEU indujo un aumento significativo en el peso de los ovarios y la masa ovárica en ratas obesas, a su vez, el tratamiento redujo el peso uterino en ambas cepas ($p < 0.05$).

3.2 Ciclo estral:

Antes del tratamiento, las ratas obesas presentaban ciclos irregulares con predominio de la fase de diestro. Tras la administración de LEU, se observó una disminución en la incidencia de diestro y un aumento en la frecuencia de las fases de proestro y estro. Estos cambios sugieren una restauración parcial de la ciclicidad ovárica.

3.3 Ovarios:

El tratamiento con LEU provocó un incremento significativo en el número de cuerpos lúteos y folículos sanos en las ratas obesas. Además, se observó una reducción en la presencia de quistes ováricos en esta cepa, mientras que en las ratas normopeso se documentó un aumento en la formación de quistes. En las ratas obesas, también se redujo el número de folículos atresicos y se incrementó el total de folículos. En contraste, en las ratas normopeso, el tratamiento provocó una disminución en los folículos sanos y un aumento en los atresicos, indicando un posible efecto supresor sobre la función ovárica en animales normopeso.

3.4 Desarrollo folicular:

LEU mejoró el desarrollo folicular en ratas obesas, reflejado en un mayor número de folículos en desarrollo, así como folículos antrales y preovulatorios. No obstante, en las ratas normopeso, el tratamiento con LEU redujo el desarrollo folicular en todas las categorías analizadas.

4. Útero:

Las ratas obesas presentaron un diámetro uterino y un grosor endometrial menores en comparación con las normopeso. El tratamiento con LEU disminuyó tanto el grosor endometrial como el diámetro uterino en las ratas delgadas; sin embargo, en las ratas obesas solo se evidenció una reducción significativa del diámetro uterino ($p < 0.05$), sin afectar de forma significativa el grosor del endometrio.

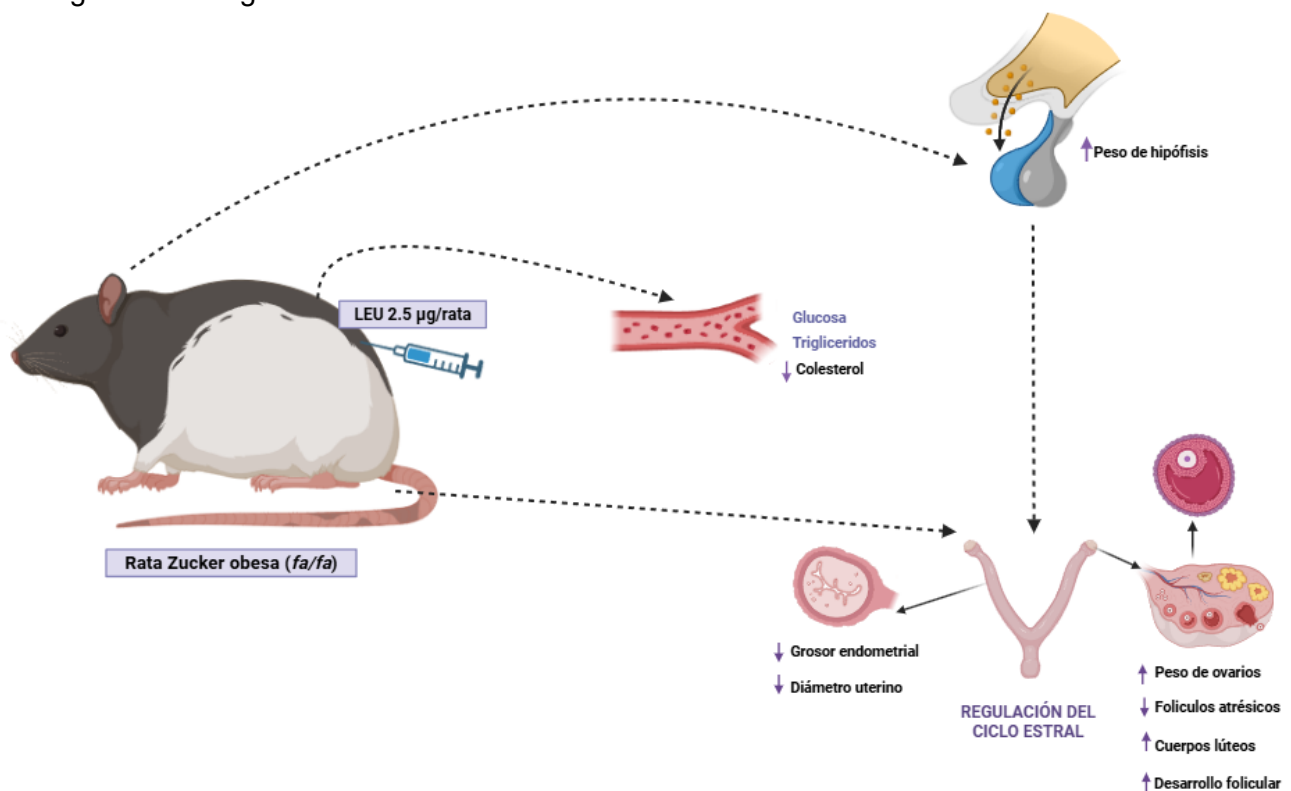


Figura 33. Representación esquemática de los principales resultados observados en ratas Zucker obesas tras la administración subcutánea de 2.5 µg/rata de LEU durante 21 días. Elaborado en BioRender por Natalia Martínez García.

DISCUSIÓN

Los hallazgos de este estudio muestran que la administración de acetato de leuprolide ejerce efectos diferenciales sobre la función reproductiva según el estado metabólico del organismo. En el primer experimento establecimos la dosis de 2.5 µg/rata de acetato de leuprolide administrada durante tres días como la más efectiva en ratas Zucker obesas para favorecer el desarrollo folicular y la ovulación, lo que sugiere que la obesidad condiciona la sensibilidad del eje hipotálamo-hipófisis-gónada frente a agonistas de GnRH. Este resultado adquiere relevancia porque contrasta con lo observado en animales normopeso, donde dosis más altas incrementaron la atresia folicular, lo que refuerza la necesidad de considerar el contexto metabólico en la definición de esquemas terapéuticos.

Para el segundo experimento, donde el agonista se administró durante 21 días, la selección de la dosis de 2.5 µg/rata se basó en nuestros primeros resultados y además en estudios previos. Patel y Shah (2018) demostraron que una dosis de 2.5 µg/rata de LEU en ratas con SOP inducido por letrozol, con normo peso, pero bajo una dieta alta en grasas al 40% durante 105 días, mejoraba la función ovárica en ese modelo. Asimismo, Knudtson *et al.* (2017) reportaron un efecto estimulante en la función ovárica tras administrar la misma dosis en un modelo de rata adolescente tratada con quimioterapia. Por otro lado, Ozcelik *et al.* (2010) encontraron que el tratamiento con LEU a esta misma dosis, administrado antes de la quimioterapia, ejercía un efecto beneficioso sobre el recuento de folículos ováricos en ratas. En conjunto, estas evidencias respaldan la idea de que dosis intermedias de agonistas de GnRH poseen un potencial terapéutico tanto en contextos de disfunción reproductiva inducida como en condiciones metabólicamente adversas.

En este trabajo, el tratamiento prolongado (21 días) con acetato de leuprolide (2.5 µg/rata) no indujo cambios significativos en el peso corporal de las ratas Zucker obesas (OZDF) ni en las Long Evans (LE). Este resultado era esperable, dado que la obesidad en el modelo Zucker se debe a una mutación en el receptor de leptina (LEPR), la cual ocasiona una resistencia severa a esta hormona y altera de manera importante la regulación central del equilibrio energético (Aleixandre y Miguel, 2008).

La leptina, producida por el tejido adiposo, es una hormona clave en la regulación de la ingesta calórica y del gasto energético mediante su acción sobre el hipotálamo. En las ratas Zucker obesas, la incapacidad del receptor LEPR para responder a la leptina genera un estado de hiperleptinemia sin efecto regulador, que favorece la hiperfagia y reduce el gasto energético (Ahima y Flier, 2000). Además, estas ratas presentan hiperplasia e hipertrofia de adipocitos, lo que contribuye a su fenotipo obeso (Johnson *et al.*, 1971).

En la edad adulta, el peso corporal de los animales homocigotos puede superar en un 60 % al de los animales normopeso, evidenciando una alteración severa en la regulación del almacenamiento lipídico y del metabolismo energético (Aleixandre y Miguel, 2008). También se ha descrito que la resistencia a la leptina limita la flexibilidad metabólica del organismo, dificultando su adaptación a cambios en la homeostasis energética (Aleixandre y Miguel, 2008). En este contexto, el agonista de GnRH probablemente no ejerce un impacto directo sobre la regulación del peso corporal, dado que su principal mecanismo de acción se dirige al eje reproductivo. Tortoriello *et al.* (2004) demostraron

que en ratones resistentes a leptina las alteraciones metabólicas subyacentes predominan sobre los efectos de tratamientos hormonales.

Finalmente, otros estudios han señalado que para lograr una reducción del peso corporal en modelos como las ratas Zucker, se requieren tratamientos prolongados o combinaciones terapéuticas que modulen de manera sostenida el metabolismo. Un ejemplo es el estudio de Bour *et al.* (2003), donde la administración intraperitoneal de octopamina (81 $\mu\text{mol/kg}$), combinada con restricción calórica durante cuatro semanas, generó una reducción del 19 % del peso corporal en ratas Zucker obesas, lo que resalta la importancia de intervenciones multifactoriales para obtener efectos significativos en este modelo.

El hecho de que no se observaran cambios en la longitud corporal entre grupos tratados y no tratados indica que ni la obesidad de origen genético ni los tratamientos hormonales con LEU afectan directamente el crecimiento esquelético en la etapa adulta. Este resultado concuerda con lo reportado en otros modelos animales, donde se ha observado que las variaciones en la longitud corporal son más pronunciadas durante el desarrollo temprano y tienden a ser menos sensibles a las intervenciones farmacológicas en fases posteriores (Wilson *et al.*, 2007; Broughton y Moley, 2017).

En cuanto a los parámetros metabólicos, las ratas Zucker presentaron niveles séricos significativamente más elevados de glucosa, triglicéridos y colesterol en comparación con las ratas Long-Evans. El agonista no modificó las concentraciones de glucosa ni de triglicéridos; sin embargo, los niveles de colesterol se redujeron de manera significativa en las ratas Zucker obesas. En organismos normopeso, la homeostasis de la glucosa se mantiene gracias a una compleja red de señales hormonales y neuropéptidos que involucran al cerebro, el páncreas, el hígado, el intestino, el tejido adiposo y el músculo. Dentro de esta red, el páncreas tiene un papel central mediante la secreción de insulina y glucagón para regular los niveles de glucosa en sangre. Ante una disminución de estos niveles, el páncreas libera glucagón, lo que estimula la glucogenólisis y la producción hepática de glucosa (Röder *et al.*, 2016). Por el contrario, tras la ingesta de alimentos, la captación de glucosa por las células β pancreáticas a través de GLUT2 desencadena una cascada de eventos que culmina en la secreción de insulina, facilitando así la captación de glucosa en tejidos dependientes de insulina y promoviendo la glucogénesis (Henquin, 2000; Röder *et al.*, 2016). En modelos de obesidad, como la rata Zucker, este mecanismo se encuentra alterado debido a una resistencia severa a la insulina, lo que impacta negativamente la captación y utilización de glucosa. Estudios previos han evaluado el efecto del LEU sobre la homeostasis de la glucosa en modelos con resistencia a la insulina. En ratas con SOP inducido por letrozol, la administración de leuprolide no mejoró la sensibilidad a la insulina ni la homeostasis de la glucosa (Patel y Shah, 2018). En mujeres con SOP, el tratamiento con LEU solo mejoró la sensibilidad a la insulina en casos de resistencia leve, mientras que no produjo cambios en presencia de resistencia severa (Elkind-Hirsch, Valdes y Malinak, 1993). En lo que respecta al metabolismo lipídico, en organismos con normopeso, este proceso se encuentra estrictamente regulado, asegurando un equilibrio entre la absorción, transporte y utilización de los lípidos. En las ratas Zucker obesas, se ha documentado un perfil lipídico alterado caracterizado por un aumento en los niveles de VLDL y HDL, pero sin elevación del colesterol LDL, estas alteraciones reflejan una disfunción metabólica con similitudes al síndrome metabólico humano (Alexandre y Miguel, 2008). En este estudio, la administración de leuprolide durante 21 días resultó

en una disminución significativa de los niveles de colesterol total en sangre en ratas Zucker obesas. Estudios previos han reportado que la administración de LEU en ratas con SOP inducido por letrozol permitió restaurar el perfil lipídico, reduciendo significativamente los niveles de colesterol total y triglicéridos en comparación con el grupo control (Patel y Shah, 2018). La disminución significativa de los niveles séricos de colesterol total observada en ratas Zucker obesas en este trabajo experimental puede explicarse por un aumento en la demanda de colesterol como precursor esencial para la síntesis de hormonas esteroideas. Este efecto podría estar mediado por la activación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada inducida por el agonista de GnRH, el cual estimula la secreción de LH y FSH, favoreciendo así la reactivación de la esteroidogénesis ovárica. Aunque en este estudio no se midieron directamente las concentraciones de hormonas esteroideas, la evidencia sugiere que la disminución del colesterol sérico podría reflejar una mayor captación y utilización de este lípido por parte del ovario en respuesta a la estimulación hormonal inducida por leuprolide y que llevo a una mejora en los parámetros reproductivos como se discute en los siguientes párrafos.

En cuanto al peso relativo de los órganos, las ratas Zucker obesas presentaron valores inferiores en comparación con las ratas Long-Evans. Este hallazgo es consistente con estudios previos que han asociado la obesidad con una reducción en el tamaño relativo de los órganos, atribuida a un entorno proinflamatorio crónico y a alteraciones en la regulación hormonal (Silvestris *et al.*, 2018). Marín Bivens y Olster (1997) sugieren que esta disminución podría deberse a una menor vascularización tisular, como consecuencia de la resistencia a la insulina y del desequilibrio en la secreción hormonal característico del estado metabólico obeso. Trabajos futuros son necesarios para entender mejor este fenómeno.

Respecto a los parámetros reproductivos, los resultados del presente estudio evidenciaron múltiples alteraciones en las ratas Zucker obesas, entre las que destacan una menor masa ovárica, alteraciones en la dinámica del ciclo estral, una reducción en la ovulación y una mayor presencia de folículos atrésicos y estructuras quísticas. No obstante, la administración de LEU durante 21 días indujo una respuesta favorable en estas ratas, lo que contribuyó a restaurar parcialmente la función reproductiva en este modelo de obesidad. En primer lugar, se observó un aumento significativo en el peso relativo de la hipófisis en las ratas obesas tratadas con LEU, este hallazgo sugiere una activación sostenida del receptor de GnRH (GnRHR), acoplado a proteínas G, que puede desencadenar cascadas de señalización intracelular como las vías MAPK, particularmente ERK y JNK (Kraus, Naor y Seger, 2001). En células gonadotropas, esta activación implica a proteínas como PKC, c-Src y Ras, promoviendo la expresión de factores de transcripción como c-Fos y c-Jun, esenciales para el crecimiento celular.

Respecto al ciclo estral, las ratas obesas mostraron ciclos prolongados e irregulares, con predominio de la fase de diestro y reducción de fases proliferativas como proestro y estro, reflejo de una disfunción en la señalización cíclica del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. Tras el tratamiento con LEU, se documentó una mejoría en la ciclicidad, con mayor frecuencia de fases proliferativas, lo que sugiere una reactivación funcional del eje (Tortoriello *et al.*, 2004; Brann *et al.*, 2002). En contraste, en ratas normopeso, LEU provocó una inhibición del ciclo, probablemente por desensibilización hipofisaria, como se ha observado en humanos bajo tratamiento crónico con agonistas de GnRH (Practice Committee of ASRM, 2021). La restauración parcial de la ciclicidad observada en ratas obesas tratadas con LEU puede estar relacionada con una reactivación de la señalización del eje

hipotálamo-hipófisis-gónada inducida por el agonista de GnRH. Se ha propuesto que el LEU puede revertir la atrofia ovárica al modular la secreción de LH y FSH, permitiendo una mejor sincronización del ciclo estral y una mayor actividad esteroideogénica (Centeno, 2016). Por otro lado, en mujeres normometabólicas, el uso continuo de LEU provoca supresión hipofisaria y detención del ciclo ovárico, efecto deseado en contextos como endometriosis o preparación para técnicas de reproducción asistida (Practice Committee of ASRM, 2021).

En cuanto a la función ovárica, las ratas Zucker obesas presentaron una reducción del peso de los ovarios en comparación con las ratas normopeso. Tras el tratamiento con LEU se observó una recuperación parcial de la masa ovárica en ratas obesas, probablemente mediada por la activación de GnRHR ováricos y por vías intracelulares como MAPK y calcineurina-NFAT (Pratap *et al.*, 2017; Scotti *et al.*, 2011). Este efecto coincide con estudios previos donde el LEU mejoró la arquitectura ovárica en modelos de síndrome de ovario poliquístico (SOP) o estrés oxidativo (Patel y Shah, 2018; Torres *et al.*, 2005).

La administración de LEU también promovió una mejora significativa en la capacidad ovulatoria de las ratas obesas, reflejada en el aumento del número de cuerpos lúteos. Este hallazgo es coherente con los efectos de estimulación inicial de las gonadotropinas antes de la desensibilización hipofisaria, descritos tanto en modelos animales como humanos (Patel y Shah, 2018; Elkind-Hirsch *et al.*, 1993). En ratas normopeso, sin embargo, LEU redujo la ovulación, lo que refuerza la necesidad de considerar el estado metabólico al definir esquemas terapéuticos. Este hallazgo concuerda con estudios como el de Patel y Shah (2018), quienes observaron un aumento en el número de cuerpos lúteos tras la administración de LEU en ratas con síndrome de ovario poliquístico inducido por letrozol. Del mismo modo, Ozcelik *et al.* (2014) demostraron que la administración prolongada de LEU puede inducir ovulación y regular la función ovárica. La presencia de estructuras quísticas fue más frecuente en las ratas obesas y se redujo tras el tratamiento con LEU, mientras que en las ratas normopeso se observó un aumento en dichas formaciones. Este hallazgo es coherente con la literatura, que indica que la administración prolongada de agonistas de GnRH puede inducir un estado hipogonadotrópico sostenido al desensibilizar los receptores hipofisarios, lo que disminuye la secreción de LH y FSH. Esta supresión hormonal puede impedir la maduración folicular y la ovulación, generando la acumulación de folículos no ovulados con potencial de convertirse en quistes (Scotti *et al.*, 2011; Serrano-Mujica *et al.*, 2017).

En relación con la población folicular, las ratas obesas presentaron una reducción significativa de folículos en desarrollo y folículos totales y un incremento de folículos atrésicos, lo cual se ha atribuido a estrés oxidativo, inflamación crónica y alteraciones en la señalización de gonadotropinas (Serrano Mujica *et al.*, 2017). El tratamiento con LEU en este grupo promovió un aumento en los folículos en desarrollo, folículos totales y una reducción en la atresia folicular, este efecto coincide con lo reportado por Patel y Shah (2018), quienes encontraron que el tratamiento con leuprolide en ratas con SOP promovió el crecimiento folicular y redujo la apoptosis en células de la granulosa.

Los resultados histológicos en útero muestran que las ratas Zucker obesas presentaron un diámetro uterino y un grosor endometrial significativamente menores en comparación con las ratas Long Evans. Esta disminución podría deberse a la disfunción endocrina característica de la obesidad, como la hiperinsulinemia, la resistencia a la leptina y la alteración del eje hipotálamo-hipófisis

gónada, que afectan negativamente la esteroidogénesis y reducen la estimulación estrogénica. Tras la administración de LEU, se observó una reducción significativa del diámetro uterino y del grosor endometrial en ratas obesas y normopeso. Este efecto fue más evidente en las ratas normopeso, donde la disminución fue estadísticamente significativa respecto al grupo control. En el caso de las ratas obesas, aunque la tendencia fue similar, la reducción del grosor endometrial no alcanzó significancia estadística tras el tratamiento prolongado. Estos hallazgos coinciden con lo reportado por Tesone *et al.* (2008), quienes demostraron que el acetato de leuprolide, administrado en concentraciones de 1 a 100 ng/ml durante 24 horas en cultivos primarios de células epiteliales endometriales humanas, ejerce un efecto atrofiante sobre el endometrio. Este efecto se explica por la supresión hipofisaria de gonadotropinas y la consecuente disminución de estrógenos circulantes, pero también por mecanismos directos sobre el tejido endometrial. En este contexto, estudios como los de Borroni *et al.* (2000) y Tesone *et al.* (2008) han documentado que el LEU induce apoptosis endometrial a través de la regulación de proteínas pro apoptóticas (Bax, FasL) e inhibición de anti-apoptóticas (Bcl-2), lo cual contribuye a la regresión del tejido.

A nivel molecular, también se ha observado una reducción en la expresión de factores angiogénicos como VEGF-A e IL-1 β , que limita la proliferación y vascularización endometrial (Tesone *et al.* 2008). El efecto del LEU sobre el útero se ha aprovechado clínicamente en el tratamiento de condiciones como miomatosis y endometriosis, donde se busca una atrofia funcional del endometrio (Emons y Schally, 1994; Khan *et al.*, 2010). Estos efectos no solo derivan de la supresión hormonal central, sino también de acciones locales sobre el tejido uterino. Se ha identificado la expresión de receptores de GnRH en el útero, lo que permite una respuesta directa al agonista mediante vías autocrinas y paracrinas (Cheng y Leung, 2000; Meresman *et al.*, 2008). Khan *et al.* (2010), mostraron que los agonistas de GnRH reducen el volumen uterino total y el grosor endometrial como parte de su acción terapéutica, por lo que es claro que leuprolide tiene una acción dual, tanto central como periférica, lo que permite explicar la reducción progresiva del diámetro y grosor uterino observada en ambos grupos experimentales. Sin embargo, la menor magnitud de respuesta en las ratas obesas sugiere una posible resistencia tisular o una alteración en la expresión local de GnRHR en el útero bajo condiciones metabólicas.

En conjunto, los resultados del presente estudio sugieren una posible utilidad terapéutica del LEU para restaurar la función reproductiva en contextos de obesidad severa, posicionándolo como un candidato experimental de interés en el estudio de la infertilidad asociada a alteraciones metabólicas.

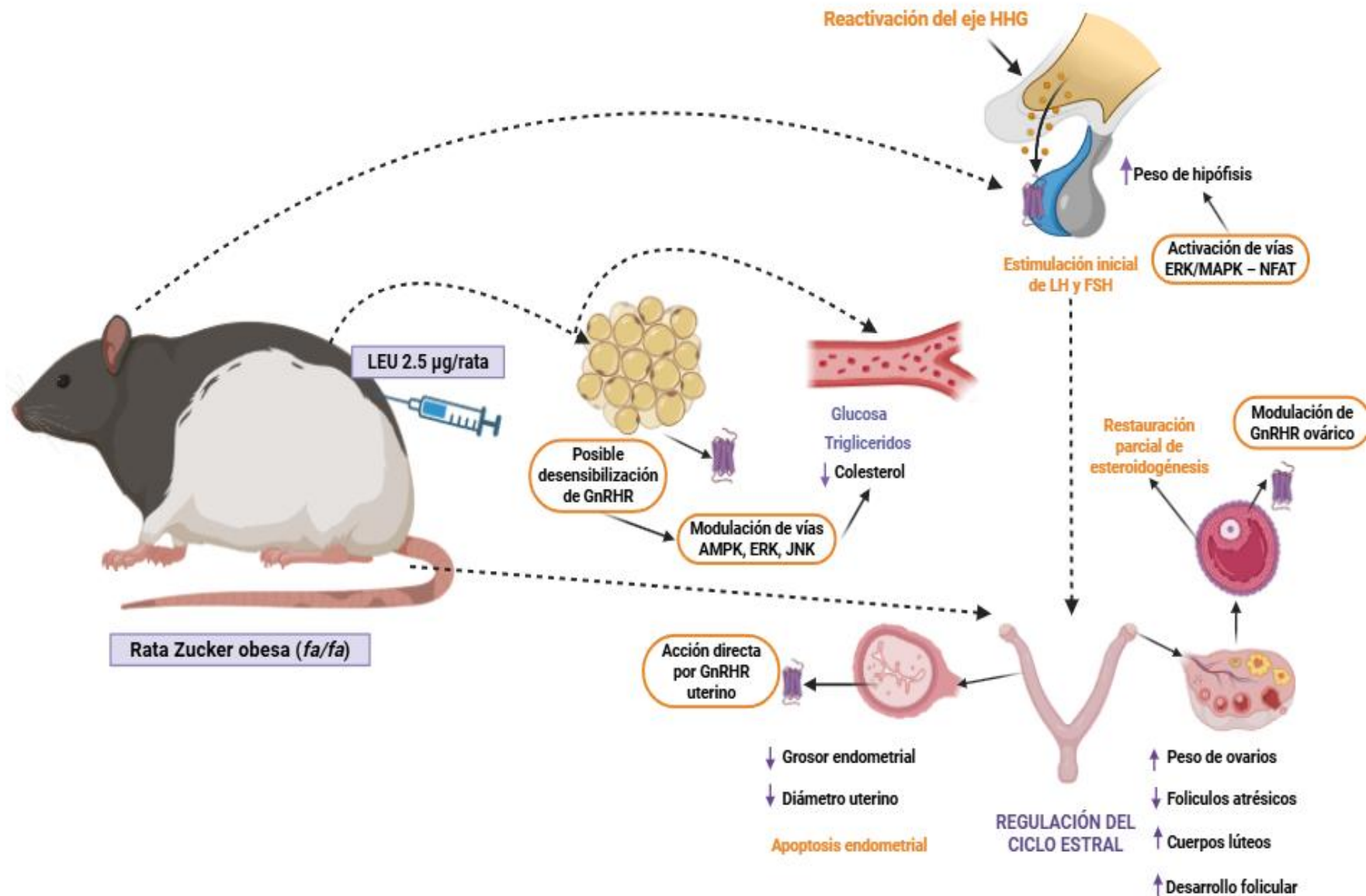


Figura 34. Representación esquemática de los principales efectos observados en ratas Zucker obesas tras la administración subcutánea de 2.5 µg/rata de LEU durante 21 días. Los hallazgos resaltados en morado indican respuestas fisiológicas tras el tratamiento y los marcados en naranja corresponden posibles respuestas a dichos cambios de acuerdo con lo reportado en la literatura. El diagrama sintetiza los efectos a nivel reproductivo, metabólico y morfofuncional observados en el estudio. Elaborado en BioRender por Natalia Martínez García.

CONCLUSIÓN

A través de una curva de concentración-respuesta, se determinó que la dosis óptima de 2.5 µg/rata permitió preservar la población folicular y estimular la ovulación sin inducir efectos adversos sobre el metabolismo, estableciendo así su utilidad como herramienta experimental en contextos de disfunción reproductiva asociada a obesidad.

Durante el tratamiento prolongado de 21 días con LEU, se observaron mejoras notables en la dinámica folicular, la ciclicidad estral y la ovulación, junto con una recuperación parcial del peso ovárico.

En términos metabólicos, si bien la administración de LEU por tres días no produjo cambios significativos en glucosa ni lípidos, su uso durante 21 días redujo de manera significativa los niveles de colesterol total en las ratas obesas.

En el útero, los resultados histológicos revelaron una disminución significativa del diámetro uterino y del grosor endometrial en ambos esquemas de tratamiento con LEU en ratas delgadas. En las ratas obesas, aunque se observó una tendencia a la reducción del grosor endometrial, esta no fue estadísticamente significativa tras el tratamiento prolongado, lo que podría reflejar una resistencia tisular al efecto del LEU.

En conjunto, estos hallazgos respaldan la hipótesis de que el acetato de leuprolide estimula la función ovárica y modula el espesor endometrial en organismos con disfunción metabólica

PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

Futuros estudios deberán enfocarse en caracterizar los mecanismos moleculares específicos mediante los cuales el LEU ejerce sus efectos sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónada en condiciones de obesidad. Será fundamental evaluar la calidad de los ovocitos a través de estudios de morfología, así como analizar la capacidad de lograr preñez en modelos experimentales, lo que permitirá determinar el impacto funcional del tratamiento sobre la fertilidad. Además, se recomienda investigar la expresión de marcadores de proliferación celular ovárica y de apoptosis, a fin de comprender en mayor profundidad los procesos celulares subyacentes al remodelado ovárico inducido por LEU. Finalmente, el diseño de estudios preclínicos y clínicos contribuirá a validar la eficacia y seguridad del tratamiento en mujeres con trastornos reproductivos vinculados a obesidad.

LITERATURA CITADA

1. Ahmed, B., & Konje, J. C. (2023). The epidemiology of obesity in reproduction. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology*, 89, 102342. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2023.102342>
2. Akamine, E. H., Marçal, A. C., Camporez, J. P., Hoshida, M. S., Caperuto, L. C., Bevilacqua, E., & Carvalho, C. R. (2010). Obesity induced by high-fat diet promotes insulin resistance in the ovary. *The Journal of endocrinology*, 206(1), 65–74. <https://doi.org/10.1677/JOE-09-0461>
3. Aleixandre, A., y Miguel, M. (2008). Ratas Zucker como modelo experimental para el estudio de diferentes enfermedades. *Endocrinología y nutrición : órgano de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición*, 55(5), 217–222. [https://doi.org/10.1016/S1575-0922\(08\)70670-3](https://doi.org/10.1016/S1575-0922(08)70670-3)
4. Alnowihi, S. M., Al Doghathier, H. A., & Osman, N. N. (2020). Serum visfatin concentration and its relationship with sex hormones in obese Saudi women. *International journal of health sciences*, 14(3), 9–13.
5. Ambrosetti, V., Guerra, M., Ramírez, L. A., Reyes, A., Álvarez, D., Olgún, S., González-Mañan, D., Fernandois, D., Sotomayor-Zárate, R., & Cruz, G. (2016). Increase in endogenous estradiol in the progeny of obese rats is associated with precocious puberty and altered follicular development in adulthood. *Endocrine*, 53(1), 258–270. <https://doi.org/10.1007/s12020-016-0858-0>
6. Ameer, M. A., Fagan, S. E., Sosa-Stanley, J. N., & Peterson, D. C. (2022). Anatomy, Abdomen and Pelvis: Uterus. In StatPearls. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470297/>
7. Baerwald, A. R., Adams, G. P., & Pierson, R. A. (2012). Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. *Human reproduction update*, 18(1), 73–91. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmr039>
8. Barrios, J., Barrios, E., y Vergara, J. (2013). Efecto de la obesidad en la reproducción femenina. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 44(3), 8-18. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952013000300002&lng=es&tlng=es
9. Berger, H., Heinrich, N., Albrecht, E., Kertscher, U., Oehlke, J., Bienert, M., Schäfer, H., Baeger, I., & Mehli, B. (1991). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) analogs: relationship between their structure, proteolytic inactivation and pharmacokinetics in rats. *Regulatory peptides*, 33(3), 299–311. [https://doi.org/10.1016/0167-0115\(91\)90232-6](https://doi.org/10.1016/0167-0115(91)90232-6)
10. Bettahar, K., y Pinton, A. (2019). Agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). *EMC-Ginecología-Obstetricia*, 55(2), 1-9.
11. Biswas, A., Ng, B. H., Prabhakaran, V. S., & Chan, C. J. (2022). Squeezing the eggs to grow: The mechanobiology of mammalian folliculogenesis. *Frontiers in cell and developmental biology*, 10, 1038107. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1038107>
12. Block, E. (1951). Quantitative morphological investigations of the follicular system in women; variations in the different phases of the sexual cycle. *Acta endocrinologica*, 8(1), 33–54. <https://doi.org/10.1530/acta.0.0080033>
13. Boletín Oficial de la República Argentina. (2015). Ministerio de Salud Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (A.N.M.A.T.). Disposición 9306/2015. Recuperado de https://boletin.anmat.gob.ar/Noviembre_2015/Dispo_9306-15.pdf
14. Bongrani, A., Mellouk, N., Rame, C., Cornuau, M., Guérif, F., Froment, P., & Dupont, J. (2019). Ovarian Expression of Adipokines in Polycystic Ovary Syndrome: A Role for Chemerin, Omentin, and Apelin in Follicular Growth Arrest and Ovulatory Dysfunction?. *International journal of molecular sciences*, 20(15), 3778. <https://doi.org/10.3390/ijms20153778>

15. Bonilla, L. (2018). *Guía básica de estimulación ovárica*. Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, España: Servicio de Obstetricia y Ginecología
16. Bour, S., Visentin, V., Prévot, D., & Carpené, C. (2003). Moderate weight-lowering effect of octopamine treatment in obese Zucker rats. *Journal of physiology and biochemistry*, 59(3), 175–182. <https://doi.org/10.1007/BF03179913>
17. Brann, D. W., Wade, M. F., Dhandapani, K. M., Mahesh, V. B., & Buchanan, C. D. (2002). Leptin and reproduction. *Steroids*, 67(2), 95–104. [https://doi.org/10.1016/s0039-128x\(01\)00138-6](https://doi.org/10.1016/s0039-128x(01)00138-6) Ahima, R. S., y Flier, J. S. (2000). Leptin and the neuroendocrinology of fasting. *Annual Review of Physiology*, 62(1), 413–437.
18. Brannian, J. D., Schmidt, S. M., Kreger, D. O., & Hansen, K. A. (2001). Baseline non-fasting serum leptin concentration to body mass index ratio is predictive of IVF outcomes. *Human reproduction (Oxford, England)*, 16(9), 1819–1826. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.9.1819>
19. Brawer, J. R., Munoz, M., & Farookhi, R. (1986). Development of the polycystic ovarian condition (PCO) in the estradiol valerate-treated rat. *Biology of reproduction*, 35(3), 647–655. <https://doi.org/10.1095/biolreprod35.3.647>
20. Bray G. A. (1997). Obesity and reproduction. *Human reproduction (Oxford, England)*, 12 Suppl 1, 26–32. https://doi.org/10.1093/humrep/12.suppl_1.26
21. Brewer, C. J., & Balen, A. H. (2010). The adverse effects of obesity on conception and implantation. *Reproduction (Cambridge, England)*, 140(3), 347–364. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0568>
22. Broughton, D. E., & Moley, K. H. (2017). Obesity and female infertility: potential mediators of obesity's impact. *Fertility and sterility*, 107(4), 840–847. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.01.017>
23. Byskov A. G. (1974). Cell kinetic studies of follicular atresia in the mouse ovary. *Journal of reproduction and fertility*, 37(2), 277–285. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0370277>
24. CECMED-Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos, Ministerios de Salud Pública de Cuba. (2015). PROCRIIN, Acetato de Leuprorelina. Recuperado de <https://www.cecmecd.cu/file/1225/download?token=5WoxP9Hm>
25. Centeno, I. (2016). Infertilidad y del síndrome de ovario poliquístico. *Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela*, 76, S47-S58.
26. Chávez-Genaro, R., Toledo, A., Hernández, K., & Anesetti, G. (2022). Structural and functional changes in rat uterus induced by neonatal androgenization. *Journal of molecular histology*, 53(6), 903–914. <https://doi.org/10.1007/s10735-022-10106-5>
27. Chelich, A. M., & Edmonds, E. S. (1981). Copulatory behavior and reproductive capacity of the genetically obese female Zucker rat. *Physiology & behavior*, 27(2), 331–335. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(81\)90276-6](https://doi.org/10.1016/0031-9384(81)90276-6)
28. Chelich, A. M., & Edmonds, E. S. (1986). Pseudopregnancy and the decidual response in the obese Zucker rat: a reexamination. *Biology of reproduction*, 34(5), 805–808. <https://doi.org/10.1095/biolreprod34.5.805>
29. Cheng, K. W., & Leung, P. C. (2000). The expression, regulation and signal transduction pathways of the mammalian gonadotropin-releasing hormone receptor. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 78(12), 1029–1052.
30. Childs, G. V., Odle, A. K., MacNicol, M. C., & MacNicol, A. M. (2021). The Importance of Leptin to Reproduction. *Endocrinology*, 162(2), bqaa204. <https://doi.org/10.1210/endocr/bqaa204>
31. Christenson, L. K., & Strauss, J. F., 3rd (2000). Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and the intramitochondrial translocation of cholesterol. *Biochimica et biophysica acta*, 1529(1-3), 175–187. [https://doi.org/10.1016/s1388-1981\(00\)00147-5](https://doi.org/10.1016/s1388-1981(00)00147-5)

32. Clarkson, J., Han, S. Y., Piet, R., McLennan, T., Kane, G. M., Ng, J., Porteous, R. W., Kim, J. S., Colledge, W. H., Iremonger, K. J., & Herbison, A. E. (2017). Definition of the hypothalamic GnRH pulse generator in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(47), E10216–E10223. <https://doi.org/10.1073/pnas.1713897114>
33. Clayton, R. N., & Catt, K. J. (1981). Regulation of pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors by gonadal hormones. *Endocrinology*, 108(3), 887–895. <https://doi.org/10.1210/endo-108-3-887>
34. Cleary, M. P., & Phillips, F. C. (1999). The presence of the "fa" gene in heterozygous (FA/fa) lean female rats, effects on body weight, body fat and serum leptin. *Obesity research*, 7(3), 293–298. <https://doi.org/10.1002/j.1550-8528.1999.tb00409.x>
35. Clément, F., Crépieux, P., Yvinec, R., & Monniaux, D. (2020). Mathematical modeling approaches of cellular endocrinology within the hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *Molecular and cellular endocrinology*, 518, 110877. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110877>
36. Conn, P. M., & Crowley, W. F., Jr (1994). Gonadotropin-releasing hormone and its analogs. *Annual review of medicine*, 45, 391–405. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.45.1.391>
37. Conti, M., Hsieh, M., Zamah, A. M., & Oh, J. S. (2012). Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Molecular and cellular endocrinology*, 356(1-2), 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.11.002>
38. Cora, M. C., Kooistra, L., & Travlos, G. (2015). Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicologic pathology*, 43(6), 776–793. <https://doi.org/10.1177/0192623315570339>
39. Crosignani, P. G., Colombo, M., Vegetti, W., Somigliana, E., Gessati, A., & Ragni, G. (2003). Overweight and obese anovulatory patients with polycystic ovaries: parallel improvements in anthropometric indices, ovarian physiology and fertility rate induced by diet. *Human reproduction (Oxford, England)*, 18(9), 1928–1932. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg367>
40. De la Cruz, R.R., y Pásaro, R. (1998) Control endocrino del ciclo reproductor en la rata: una experiencia docente utilizando un método de caracterización citológico. *Revista de Enseñanza Universitaria* 545-554.
41. De la Riva, S. (2018). *Inmunomodulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada: Valoración del conejo como biomodelo para el estudio de la fisiología de la reproducción* [tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid] Repositorio Institucional UCM. <https://docta.ucm.es/entities/publication/5932d0d7-a807-4eeb-9379-9320db387ff3>
42. De la Rosa, J. (2018). *Participación de los receptores Kiss1R en el desarrollo celular uterino y la pubertad de ratas wistar*. [tesis de licenciatura, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla] Repositorio Institucional BUAP. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/9106>
43. De Lugo, E. A. B., y Jurado, L. P. (2006). La rata Zucker como modelo para el estudio de la función reproductora. *Endocrinología y nutrición*, 53(10), 592-598.
44. diZerega, G. S., & Hodgen, G. D. (1981). Folliculogenesis in the primate ovarian cycle. *Endocrine reviews*, 2(1), 27–49. <https://doi.org/10.1210/edrv-2-1-27>
45. Duggal, P. S., Van Der Hoek, K. H., Milner, C. R., Ryan, N. K., Armstrong, D. T., Magoffin, D. A., & Norman, R. J. (2000). The in vivo and in vitro effects of exogenous leptin on ovulation in the rat. *Endocrinology*, 141(6), 1971–1976. <https://doi.org/10.1210/endo.141.6.7509>
46. Elkind-Hirsch, K. E., Valdes, C. T., & Malinak, L. R. (1993). Insulin resistance improves in hyperandrogenic women treated with Lupron. *Fertility and sterility*, 60(4), 634–641. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)56213-x](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)56213-x)
47. Enríquez-Reyes, R. (2021). Obesidad: epidemia del siglo XXI y su relación con la fertilidad. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 32(2), 161-165. <https://doi.org/10.1016/j.rmcl.2020.11.006>

48. Erickson, G. F., & Shimasaki, S. (2000). The role of the oocyte in folliculogenesis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 11(5), 193–198. [https://doi.org/10.1016/s1043-2760\(00\)00249-6](https://doi.org/10.1016/s1043-2760(00)00249-6)
49. Fauser, B. C., & Van Heusden, A. M. (1997). Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. *Endocrine reviews*, 18(1), 71–106. <https://doi.org/10.1210/edrv.18.1.0290>
50. Feher, J. (2017). 9.1 - General Principles of Endocrinology. En J. Feher. *Quantitative Human Physiology*, 2^a ed., pp. 853–869. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800883-6.00084-7>
51. Feingold K. R. (2022). Lipid and Lipoprotein Metabolism. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 51(3), 437–458. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2022.02.008>
52. Flier, J. S., & Ahima, R. S. (2024). Leptin physiology and pathophysiology: knowns and unknowns 30 years after its discovery. *The Journal of clinical investigation*, 134(1), e174595. <https://doi.org/10.1172/JCI174595>
53. Fortune, J. E., Cushman, R. A., Wahl, C. M., & Kito, S. (2000). The primordial to primary follicle transition. *Molecular and cellular endocrinology*, 163(1-2), 53–60. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(99\)00240-3](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(99)00240-3)
54. Frigolet, M. E., y Gutiérrez-Aguilar, R. (2020). Los colores del tejido adiposo. *Gaceta de México*, 156(2). <https://doi.org/10.24875/GMM.20005541>
55. 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-κB and MAPK signaling in mice. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 19(1), 148. <https://doi.org/10.1186/s12958-021-00833-x>
56. Gartner, L. P. (2008) *Atlas de histología*. McGRAW HILL.
57. Gartner, P & Hiatt L. (2007) *Texto Atlas de Histología*. 3^a edición. Ed. McGraw-Hill Interamericana, 218-225.
58. Gaspar, R. S., Benevides, R. O., Fontelles, J. L., Vale, C. C., França, L. M., Barros, P.deT., & Paes, A. M. (2016). Reproductive alterations in hyperinsulinemic but normoandrogenic MSG obese female rats. *The Journal of endocrinology*, 229(2), 61–72. <https://doi.org/10.1530/JOE-15-0453>
59. Gelsomino, L., Naimo, G. D., Catalano, S., Mauro, L., & Andò, S. (2019). The Emerging Role of Adiponectin in Female Malignancies. *International journal of molecular sciences*, 20(9), 2127. <https://doi.org/10.3390/ijms20092127>
60. Ginther, O. J., Beg, M. A., Bergfelt, D. R., Donadeu, F. X., & Kot, K. (2001). Follicle selection in monovular species. *Biology of reproduction*, 65(3), 638–647. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.3.638>
61. Gnanamanickam, G. J., & Llewellyn-Smith, I. J. (2011). Innervation of the rat uterus at estrus: a study in full-thickness, immunoperoxidase-stained whole-mount preparations. *The Journal of comparative neurology*, 519(4), 621–643. <https://doi.org/10.1002/cne.22515>
62. Goldman, J. M., Murr, A. S., & Cooper, R. L. (2007). The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology*, 80(2), 84–97. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20106>
63. Goldsammler, M., Merhi, Z., & Buyuk, E. (2018). Role of hormonal and inflammatory alterations in obesity-related reproductive dysfunction at the level of the hypothalamic-pituitary-ovarian axis. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 16(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0366-6>
64. Gougeon A. (1986). Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Human reproduction (Oxford, England)*, 1(2), 81–87. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136365>

65. Gougeon A. (2010). Human ovarian follicular development: from activation of resting follicles to preovulatory maturation. *Annales d'endocrinologie*, 71(3), 132–143. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2010.02.021>
66. Grasa, P., Ploutarchou, P., & Williams, S. A. (2015). Oocytes lacking O-glycans alter follicle development and increase fertility by increasing follicle FSH sensitivity, decreasing apoptosis, and modifying GDF9:BMP15 expression. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 29(2), 525–539. <https://doi.org/10.1096/fj.14-253757>
67. Griffen, S. C., Wang, J., & German, M. S. (2001). A genetic defect in beta-cell gene expression segregates independently from the fa locus in the ZDF rat. *Diabetes*, 50(1), 63–68. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.1.63>
68. Guarraci, F. A., Avendano, L., Kelly, M., Estoesta, C., Sencherey, B., Valdivia, H. S., Gale, A., Yopez, 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>
69. Harrison, G. S., Wierman, M. E., Nett, T. M., & Glode, L. M. (2004). Gonadotropin-releasing hormone and its receptor in normal and malignant cells. *Endocrine-related cancer*, 11(4), 725–748. <https://doi.org/10.1677/erc.1.00777>
70. Henquin J. C. (2000). Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes*, 49(11), 1751–1760. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.11.1751>
71. Hertig, A. T., & Adams, E. C. (1967). Studies on the human oocyte and its follicle. I. Ultrastructural and histochemical observations on the primordial follicle stage. *The Journal of cell biology*, 34(2), 647–675. <https://doi.org/10.1083/jcb.34.2.647>
72. Hodgen G. D. (1982). The dominant ovarian follicle. *Fertility and sterility*, 38(3), 281–300. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)46509-X](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)46509-X)
73. Holesh, J. E., Bass, A. N., & Lord, M. (2023). Physiology, Ovulation. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
74. Hsueh, A. J., & Schaeffer, J. M. (1985). Gonadotropin-releasing hormone as a paracrine hormone and neurotransmitter in extra-pituitary sites. *Journal of steroid biochemistry*, 23(5B), 757–764. [https://doi.org/10.1016/s0022-4731\(85\)80011-x](https://doi.org/10.1016/s0022-4731(85)80011-x)
75. Hu, J., Zhang, Z., Shen, W. J., & Azhar, S. (2010). Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutrition & metabolism*, 7, 47. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-47>
76. Hubscher, C. H., Brooks, D. L., & Johnson, J. R. (2005). A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. *Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission*, 80(2), 79–87. <https://doi.org/10.1080/10520290500138422>
77. Imai, T., Cho, Y. M., Takahashi, M., Kitahashi, T., Takami, S., Nishikawa, A., & Ogawa, K. (2013). High susceptibility of heterozygous (+/fa) lean Zucker rats to 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinogenesis. *Oncology reports*, 29(5), 1914–1922. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2326>
78. IQB - Instituto Químico Biológico. (2014). Acetato de leuprorelina. Recuperado de <https://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/l011.htm>
79. Jamnongjit, M., & Hammes, S. R. (2006). Ovarian steroids: the good, the bad, and the signals that raise them. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 5(11), 1178–1183. <https://doi.org/10.4161/cc.5.11.2803>
80. Johnson, P. R., Zucker, L. M., Cruce, J. A., & Hirsch, J. (1971). Cellularity of adipose depots in the genetically obese Zucker rat. *Journal of lipid research*, 12(6), 706–714.

81. Jungheim, E. S., & Moley, K. H. (2010). Current knowledge of obesity's effects in the pre- and periconceptual periods and avenues for future research. *American journal of obstetrics and gynecology*, 203(6), 525–530. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.06.043>
82. Kaipia, A., & Hsueh, A. J. (1997). Regulation of ovarian follicle atresia. *Annual review of physiology*, 59, 349–363. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.59.1.349>
83. 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 axis. *Biology of reproduction*, 71(1), 266–272. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.025858>
84. Knudtson, J. F., Tellez Santos, M., Failor, C. M., Binkley, P. A., Venesky, J. P., Tekmal, R. R., Robinson, R. D., & Schenken, R. S. (2017). A Combination of a GnRH Antagonist and Agonist for Fertility Preservation in an Adolescent Female Murine Model. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 24(9), 1280–1283. <https://doi.org/10.1177/1933719116682876>
85. Leblanc, S., Battista, M. C., Noll, C., Hallberg, A., Gallo-Payet, N., Carpentier, A. C., Vine, D. F., & Baillargeon, J. P. (2014). Angiotensin II type 2 receptor stimulation improves fatty acid ovarian uptake and hyperandrogenemia in an obese rat model of polycystic ovary syndrome. *Endocrinology*, 155(9), 3684–3693. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1185>
86. Lee, E. B., Chakravarthi, V. P., Wolfe, M. W., & Rumi, M. A. K. (2021). ER β Regulation of Gonadotropin Responses during Folliculogenesis. *International journal of molecular sciences*, 22(19), 10348. <https://doi.org/10.3390/ijms221910348>
87. Lew R. (2019). Natural history of ovarian function including assessment of ovarian reserve and premature ovarian failure. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology*, 55, 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2018.05.005>
88. Li, H. & Chian, RC. (2017). Follicular Development and Oocyte Growth. In: Chian, RC., Nargund, G., Huang, J. (eds) Development of In Vitro Maturation for Human Oocytes. *Springer, Cham*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-53454-1_2
89. Linares, N., Ruiz, Y. M., Garrido-Gracia, J. C., Cañas, R. A., Gordon, A., Criado, J. E. S., y de las Mulas González, J. M. (2010). Utilidad de los agonistas moduladores selectivos y antagonistas puros del receptor de estrógenos de estudios morfofuncionales del útero de la rata. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*, 23, 97-110.
90. Long, J. A., & Evans, H. M. (1922). The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Mem Univ Calif* 6, 1–148. <http://resource.nlm.nih.gov/06120800R>
91. Louw-du Toit, R., Storbeck, K. H., Cartwright, M., Cabral, A., & Africander, D. (2017). Progestins used in endocrine therapy and the implications for the biosynthesis and metabolism of endogenous steroid hormones. *Molecular and cellular endocrinology*, 441, 31–45. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.09.004>
92. Maeng, L. Y., Cover, K. K., Landau, A. J., Milad, M. R., & Lebron-Milad, K. (2015). Protocol for studying extinction of conditioned fear in naturally cycling female rats. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 96, 52202. <https://doi.org/10.3791/52202>
93. Maggi, R., Cariboni, A. M., Marelli, M. M., Moretti, R. M., Andrè, V., Marzagalli, M., & Limonta, P. (2016). GnRH and GnRH receptors in the pathophysiology of the human female reproductive system. *Human reproduction update*, 22(3), 358–381. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv059>
94. Mansel, R. E., & Webster, D. J. T., Sweetland H.M., Hughes, L.E., Gower-Thomas, K., Evans D.G.R & Cody, H.S. (2009). CHAPTER 3 - Breast anatomy and physiology En Hughes, Mansel & Webster's Benign Disorders and Diseases of the Breast (25-40). *Elsevier Health Sciences*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-2774-1.00007-4>.

95. Marín Bivens, C. L., & Olster, D. H. (1997). Abnormal estrous cyclicity and behavioral hyporesponsiveness to ovarian hormones in genetically obese Zucker female rats. *Endocrinology*, *138*(1), 143–148. <https://doi.org/10.1210/endo.138.1.4849>
96. Márquez, M. (2022). México: Vacío legal en reproducción asistida permite un mercado para el turismo de fertilidad. *AmecoPress*, <https://amecopress.net/Mexico-Vacio-legal-en-reproduccion-asistida-permite-un-mercado-para-el-turismo-de-fertilidad4>
97. Martínez, E. (2022). *Obesidad y su relación con la ovulación y la fertilidad en modelos animales: Una revisión sistemática* [tesis de maestría, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla]. Repositorio Institucional BUAP. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/16346>
98. Matsuda, F., Inoue, N., Goto, Y., Maeda, A., Cheng, Y., Sakamaki, K., & Manabe, N. (2008). cFLIP regulates death receptor-mediated apoptosis in an ovarian granulosa cell line by inhibiting procaspase-8 cleavage. *The Journal of reproduction and development*, *54*(5), 314–320. <https://doi.org/10.1262/jrd.20051>
99. McGee, E. A., & Hsueh, A. J. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine reviews*, *21*(2), 200–214. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.2.0394>
100. Meresman, G. F., Bilotas, M., Buquet, R. A., Barañao, R. I., Sueldo, C., & Tesone, M. (2003). Gonadotropin-releasing hormone agonist induces apoptosis and reduces cell proliferation in eutopic endometrial cultures from women with endometriosis. *Fertility and sterility*, *80* Suppl 2, 702–707. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(03\)00769-6](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(03)00769-6)
101. Merhi, Z., Bazzi, A. A., Bonney, E. A., & Buyuk, E. (2019). Role of adiponectin in ovarian follicular development and ovarian reserve. *Biomedical reports*, *1*(1), 1–5. <https://doi.org/10.3892/br.2019.1213>
102. Messini, C. I., Vasilaki, A., Korona, E., Anifandis, G., Georgoulas, P., Dafopoulos, K., Garas, A., Daponte, A., & Messinis, I. E. (2019). Effect of resistin on estradiol and progesterone secretion from human luteinized granulosa cells in culture. *Systems biology in reproductive medicine*, *65*(5), 350–356. <https://doi.org/10.1080/19396368.2019.1615151>
103. Millar, R. P., Lu, Z. L., Pawson, A. J., Flanagan, C. A., Morgan, K., & Maudsley, S. R. (2004). Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocrine reviews*, *25*(2), 235–275. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0002>
104. Miller, W. L., & Auchus, R. J. (2011). The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine reviews*, *32*(1), 81–151. <https://doi.org/10.1210/er.2010-0013>
105. Miller, W. L., & Auchus, R. J. (2011). The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine reviews*, *32*(1), 81–151. <https://doi.org/10.1210/er.2010-0013>
106. Moreno, G. M. (2012). Definición y clasificación de la obesidad. *Revista Médica Clínica Las Condes*, *23*(2), 124–128.
107. Morgan, K., & Millar, R. P. (2004). Evolution of GnRH ligand precursors and GnRH receptors in protochordate and vertebrate species. *General and comparative endocrinology*, *139*(3), 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.09.015>
108. Morita, O., Knapp, J. F., Tamaki, Y., Nemeč, M. D., Varsho, B. J., & Stump, D. G. (2008). Safety assessment of dietary diacylglycerol oil: a two-generation reproductive toxicity study in rats. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, *46*(9), 3059–3068. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.06.008>
109. Morris, K. L., Namey, T. C., & Zemel, M. B. (2003). Effects of dietary carbohydrate on the development of obesity in heterozygous Zucker rats. *The Journal of nutritional biochemistry*, *14*(1), 32–39. [https://doi.org/10.1016/s0955-2863\(02\)00249-8](https://doi.org/10.1016/s0955-2863(02)00249-8)

110. Muller, S., & Cleary, M. P. (1988). Glucose metabolism in isolated adipocytes from ad Libitum- and restricted-fed lean and obese Zucker rats at two different ages. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 187(4), 398–407. <https://doi.org/10.3181/00379727-187-42680>
111. Munguía, I. Á., Montaña, L., y Hernández, V. D. (2023). La adiposidad en México: Implicaciones de las adipocinas para la función ovárica y la salud reproductiva. *CIENCIA ergo-sum*, 31(3)
112. Nederpelt, I., Georgi, V., Schiele, F., Nowak-Reppel, K., Fernández-Montalván, A. E., IJzerman, A. P., & Heitman, L. H. (2016). Characterization of 12 GnRH peptide agonists - a kinetic perspective. *British journal of pharmacology*, 173(1), 128–141. <https://doi.org/10.1111/bph.13342>
113. Nieuwenhuis, D., Pujol-Gualdo, N., Arnoldussen, I. A. C., & Kiliaan, A. J. (2020). Adipokines: A gear shift in puberty. *Obesity reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 21(6), e13005. <https://doi.org/10.1111/obr.13005>
114. Obradovic, M., Sudar-Milovanovic, E., Soskic, S., Essack, M., Arya, S., Stewart, A. J., Gojobori, T., & Isenovic, E. R. (2021). Leptin and Obesity: Role and Clinical Implication. *Frontiers in endocrinology*, 12, 585887. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.585887>
115. Oktay, K., Briggs, D., & Gosden, R. G. (1997). Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 82(11), 3748–3751. <https://doi.org/10.1210/jcem.82.11.4346>
116. Orisaka, M., Miyazaki, Y., Shirafuji, A., Tamamura, C., Tsuyoshi, H., Tsang, B. K., & Yoshida, Y. (2021). The role of pituitary gonadotropins and intraovarian regulators in follicle development: A mini-review. *Reproductive medicine and biology*, 20(2), 169–175. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12371>
117. Ozcelik, B., Turkyilmaz, C., Ozgun, M. T., Serin, I. S., Batukan, C., Ozdamar, S., & Ozturk, A. (2010). Prevention of paclitaxel and cisplatin induced ovarian damage in rats by a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Fertility and sterility*, 93(5), 1609–1614. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.02.054>
118. Pache, T. D., Wladimiroff, J. W., de Jong, F. H., Hop, W. C., & Fauser, B. C. (1990). Growth patterns of nondominant ovarian follicles during the normal menstrual cycle. *Fertility and sterility*, 54(4), 638–642. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)53821-7](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)53821-7)
119. Pacheco, J. (2010). Falla ovárica precoz. *Anales de la Facultad de Medicina*, 71(3), 191-200). UNMSM. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina San Fernando Lima, Perú.
120. 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>
121. Payne, A. H., & Hales, D. B. (2004). Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocrine reviews*, 25(6), 947–970. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0030>
122. Peluso, J. J., & Steger, R. W. (1978). Role of FSH in regulating granulosa cell division and follicular atresia in rats. *Journal of reproduction and fertility*, 54(2), 275–278. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0540275>
123. Periti, P., Mazzei, T., & Mini, E. (2002). Clinical pharmacokinetics of depot leuprorelin. *Clinical pharmacokinetics*, 41(7), 485–504. <https://doi.org/10.2165/00003088-200241070-00003>
124. Plant T. M. (2015). 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *The Journal of endocrinology*, 226(2), T41–T54. <https://doi.org/10.1530/JOE-15-0113>
125. Polo, A. (2016). Impacto de la obesidad en los ciclos de fecundación in vitro. [tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona]. Repositorio Institucional UAB. <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/378356/apr1de1.pdf?sequence=1>

126. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine & Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (2021). Obesity and reproduction: a committee opinion. *Fertility and sterility*, 116(5), 1266–1285. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2021.08.018>
127. Pratap, A., Garner, K. L., Voliotis, M., Tsaneva-Atanasova, K., & McArdle, C. A. (2017). Mathematical modeling of gonadotropin-releasing hormone signaling. *Molecular and cellular endocrinology*, 449, 42–55. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.08.022>
128. Puttabyatappa, M., & Padmanabhan, V. (2018). Developmental Programming of Ovarian Functions and Dysfunctions. *Vitamins and hormones*, 107, 377–422. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2018.01.017>
129. Quintanar, J. L., y Salinas, E. (2022). Papel dual de la leptina en la obesidad. *Lux Médica*, 17(50). <https://doi.org/10.33064/50LM20223664>
130. Quintero, Y., Bastardo, G., Angarita, C., Rivas, J.G., Suarez, C.I. y Uzcategui, A. (2020). El estudio de la obesidad desde diversas disciplinas. Múltiples enfoques una misma visión. *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo*, 18(3), 95-106.
131. Rachoń, D., & Teede, H. (2010). Ovarian function and obesity--interrelationship, impact on women's reproductive lifespan and treatment options. *Molecular and cellular endocrinology*, 316(2), 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.09.026>
132. Rance, N. E., Krajewski, S. J., Smith, M. A., Cholanian, M., & Dacks, P. A. (2010). Neurokinin B and the hypothalamic regulation of reproduction. *Brain research*, 1364, 116–128. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.08.059>
133. Real, J. T., & Ascaso, J. F. (2021). Lipid metabolism and classification of hyperlipaemias. Metabolismo lipídico y clasificación de las hiperlipemias. *Clinica e investigación en arteriosclerosis : publicación oficial de la Sociedad Española de Arteriosclerosis*, 33 Suppl 1, 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2020.12.008>
134. Ressler, I. B., Grayson, B. E., Ulrich-Lai, Y. M., & Seeley, R. J. (2015). Diet-induced obesity exacerbates metabolic and behavioral effects of polycystic ovary syndrome in a rodent model. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 308(12), E1076–E1084. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00182.2014>
135. Richards J. S. (2007). Genetics of ovulation. *Seminars in reproductive medicine*, 25(4), 235–242. <https://doi.org/10.1055/s-2007-980217>
136. Röder, P. V., Wu, B., Liu, Y., & Han, W. (2016). Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Experimental & molecular medicine*, 48(3), e219. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.6>
137. Rubino, F., Cummings, D. E., Eckel, R. H., Cohen, R. V., Wilding, J. P. H., Brown, W. A., Stanford, F. C., Batterham, R. L., Farooqi, I. S., Farpour-Lambert, N. J., le Roux, C. W., Sattar, N., Baur, L. A., Morrison, K. M., Misra, A., Kadowaki, T., Tham, K. W., Sumithran, P., Garvey, W. T., Kirwan, J. P., ... Mingrone, G. (2025). Definition and diagnostic criteria of clinical obesity. *The lancet. Diabetes & endocrinology*, 13(3), 221–262. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(24\)00316-4](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(24)00316-4)
138. Ruhlmann, C., Vetrano, R., Brugo, S., Chillik, C. F., Nodar, F., Papier, S., Garcea, M., Estofan, D., Kuperman, N. M., Lombardi, E. P., Inza, R., Husulak, A y Hobecker, J. C. (1995). Estudio comparativo multicéntrico sobre el uso de acetato de leuprolide de depósito en dosis única en hiperestimulación ovárica controlada para fertilización asistida de alta complejidad. *Reproducción*, 9-21.
139. Schally, A. V., Comaru-Schally, A. M., Nagy, A., Kovacs, M., Szepeshazi, K., Plonowski, A., Varga, J. L., & Halmos, G. (2001). Hypothalamic hormones and cancer. *Frontiers in neuroendocrinology*, 22(4), 248–291. <https://doi.org/10.1006/frne.2001.0217>
140. Schally, A. V., Coy, D. H., & Arimura, A. (1980). LH-RH agonists and antagonists. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, 18(5), 318–324. <https://doi.org/10.1002/j.1879-3479.1980.tb00507.x>

141. Scotti, L., Irusta, G., Abramovich, D., Tesone, M., & Parborell, F. (2011). Administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist affects corpus luteum vascular stability and development and induces luteal apoptosis in a rat model of ovarian hyperstimulation syndrome. *Molecular and cellular endocrinology*, 335(2), 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.01.002>
142. Sennello, L. T., Finley, R. A., Chu, S. Y., Jagst, C., Max, D., Rollins, D. E., & Tolman, K. G. (1986). Single-dose pharmacokinetics of leuprolide in humans following intravenous and subcutaneous administration. *Journal of pharmaceutical sciences*, 75(2), 158–160. <https://doi.org/10.1002/jps.2600750211>
143. Serrano Mujica, L. K., Bertolin, K., Bridi, A., Glanzner, W. G., Rissi, V. B., de Camargo, F. L., Zanella, R., Prestes, O. D., Moresco, R. N., Antoniazzi, A. Q., Dias Gonçalves, P. B., Premaor, M. O., & Comim, F. V. (2017). The impact of postnatal leuprolide acetate treatment on reproductive characteristics in a rodent model of polycystic ovary syndrome. *Molecular and cellular endocrinology*, 442, 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.12.015>
144. Shimizu T. (2016). Molecular and cellular mechanisms for the regulation of ovarian follicular function in cows. *The Journal of reproduction and development*, 62(4), 323–329. <https://doi.org/10.1262/jrd.2016-044>
145. Shirasuna, K., & Iwata, H. (2017). Effect of aging on the female reproductive function. *Contraception and reproductive medicine*, 2, 23. <https://doi.org/10.1186/s40834-017-0050-9>
146. Shivers, B. D., Harlan, R. E., Morrell, J. I., & Pfaff, D. W. (1983). Absence of oestradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurones. *Nature*, 304(5924), 345–347. <https://doi.org/10.1038/304345a0>
147. Silvestris, E., de Pergola, G., Rosania, R., & Loverro, G. (2018). Obesity as disruptor of the female fertility. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, 16(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0336-z>
148. Smith, G. W., & Meidan, R. (2014). Ever-changing cell interactions during the life span of the corpus luteum: relevance to luteal regression. *Reproductive biology*, 14(2), 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2013.12.004>
149. Smith, M. F., McIntush, E. W., & Smith, G. W. (1994). Mechanisms associated with corpus luteum development. *Journal of animal science*, 72(7), 1857–1872. <https://doi.org/10.2527/1994.7271857x>
150. Sominsky, L., Ziko, I., Soch, A., Smith, J. T., & Spencer, S. J. (2016). Neonatal overfeeding induces early decline of the ovarian reserve: Implications for the role of leptin. *Molecular and cellular endocrinology*, 431, 24–35. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.05.001>
151. Spearow J. L. (1986). Changes in the kinetics of follicular growth in response to selection for large litter size in mice. *Biology of reproduction*, 35(5), 1175–1186. <https://doi.org/10.1095/biolreprod35.5.1175>
152. Steinberg D. (1996). A docking receptor for HDL cholesterol esters. *Science (New York, N.Y.)*, 271(5248), 460–461. <https://doi.org/10.1126/science.271.5248.460>
153. Stern, J., Johnson, P. R., Greenwood, M. R., Zucker, L. M., & Hirsch, J. (1972). Insulin resistance and pancreatic insulin release in the genetically obese Zucker rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 139(1), 66–69. <https://doi.org/10.3181/00379727-139-36078>
154. Stocco D. M. (2001). StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annual review of physiology*, 63, 193–213. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.63.1.193>
155. Stouffer, R. L., Bishop, C. V., Bogan, R. L., Xu, F., & Hennebold, J. D. (2013). Endocrine and local control of the primate corpus luteum. *Reproductive biology*, 13(4), 259–271. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2013.08.002>
156. Stouffer, R. L., Xu, F., & Duffy, D. M. (2007). Molecular control of ovulation and luteinization in the primate follicle. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 12, 297–307. <https://doi.org/10.2741/2065>
157. Suárez R.G., Perera,A., Clapés, S., Fernández, T., y Egaña, E. (2013). Estandarización de un modelo para inducir obesidad en ratas. *Medisur* , 11 (5), 569-573.

158. Takeda Pharmaceuticals America, Inc. (2021). Lupron Depot (leuprolide acetate for depot suspension) prescribing information. Recuperado de: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/020263s044s0471bl.pdf
159. Taylor, J. E., Miller, B. T., Gray, K. D., Scott, R. T., Jr, Catherino, W. H., & Segars, J. H. (2010). The mechanism responsible for the supraphysiologic gonadotropin surge in females treated with gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist and primed with GnRH antagonist. *Fertility and sterility*, 93(5), 1668–1675. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.12.047>
160. Tesone, M., Bilotas, M., Barañao, R. I., & Meresman, G. (2008). The role of GnRH analogues in endometriosis-associated apoptosis and angiogenesis. *Gynecologic and obstetric investigation*, 66 Suppl 1, 10–18. <https://doi.org/10.1159/000148026>
161. Todd, B. J., Ladyman, S. R., & Grattan, D. R. (2003). Suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion but not luteinizing hormone surge in leptin resistant obese Zucker rats. *Journal of neuroendocrinology*, 15(1), 61–68. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2003.00871.x>
162. Torres, M.deM., Donadio, N., Donadio, N. F., Brandão, A. C., & Heck, B. (2005). Comparison of embryo implantation in Wistar rats that underwent ovarian stimulation using exogenous gonadotropins associated with cetrorelix acetate or leuprolide acetate. *Fertility and sterility*, 84 Suppl 2, 1235–1240. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.06.012>
163. Tortoriello, D. V., McMinn, J. E., & Chua, S. C. (2007). Increased expression of hypothalamic leptin receptor and adiponectin accompany resistance to dietary-induced obesity and infertility in female C57BL/6J mice. *International journal of obesity (2005)*, 31(3), 395–402. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803392>
164. Tortoriello, D. V., McMinn, J., & Chua, S. C. (2004). Dietary-induced obesity and hypothalamic infertility in female DBA/2J mice. *Endocrinology*, 145(3), 1238–1247. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1406>
165. Trounson, A., Anderiesz, C., Jones, G. M., Kausche, A., Lolatgis, N., & Wood, C. (1998). Oocyte maturation. *Human reproduction (Oxford, England)*, 13(3), 52–75. https://doi.org/10.1093/humrep/13.suppl_3.52
166. Uemura, T., Namiki, T., Kimura, A., Yanagisawa, T., & Minaguchi, H. (1994). Direct effects of gonadotropin-releasing hormone on the ovary in rats and humans. *Hormone research*, 41(1), 7–13. <https://doi.org/10.1159/000183936>
167. Wilson, A. C., Meethal, S. V., Bowen, R. L., & Atwood, C. S. (2007). 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>
168. Wilson, A. C., Salamat, M. S., Haasl, R. J., Roche, K. M., Karande, A., Meethal, S. V., Terasawa, E., Bowen, R. L., & Atwood, C. S. (2006). Human neurons express type I GnRH receptor and respond to GnRH I by increasing luteinizing hormone expression. *The Journal of endocrinology*, 191(3), 651–663. <https://doi.org/10.1677/joe.1.07047>
169. Wood, J. R., & Strauss, J. F. (2002). Multiple signal transduction pathways regulate ovarian steroidogenesis. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, 3(1), 33–46. <https://doi.org/10.1023/a:1012748718150>
170. Wu, H. M., Wang, H. S., Huang, H. Y., Soong, Y. K., MacCalman, C. D., & Leung, P. C. (2009). GnRH signaling in intrauterine tissues. *Reproduction (Cambridge, England)*, 137(5), 769–777. <https://doi.org/10.1530/REP-08-0397>
171. Zeleznik A. J. (2004). The physiology of follicle selection. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 2, 31. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-2-31>
172. Zhou, J., Peng, X., & Mei, S. (2019). Autophagy in Ovarian Follicular Development and Atresia. *International journal of biological sciences*, 15(4), 726–737. <https://doi.org/10.7150/ijbs.30369>