



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA

**ESTUDIO DEL EFECTO DEL ACETATO DE LEUPROLIDA SOBRE
LA COMPOSICIÓN CORPORAL EN RATAS HEMBRA WISTAR**

PRESENTA

Carlos Olvera Sandoval

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TUTOR

Dr. José Luis Quintanar Stephano

COMITÉ TUTORAL

Dr. Andrés Quintanar Stephano

Dr. Gabriel Betanzos Cabrera

Aguascalientes, Ags. Junio 2017



CARLOS OLVERA SANDOVAL
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E.

Estimado alumno:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **“ESTUDIO DEL EFECTO DEL ACETATO DE LEUPROLIDA SOBRE LA COMPOSICIÓN CORPORAL EN RATAS HEMBRA WISTAR”**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

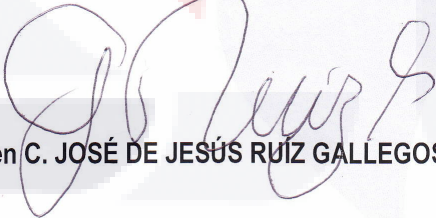
Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

A T E N T A M E N T E

Aguascalientes, Ags., a 14 de junio de 2017

“Se lumen proferre”

EL DECANO


M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS

c.c.p.- Archivo.



UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE AGUASCALIENTES
FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

ING. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

P R E S E N T E

Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **CARLOS OLVERA SANDOVAL** con ID **125122** quien realizó la tesis titulada: **ESTUDIO DEL EFECTO DEL ACETATO DE LEUPROLIDA SOBRE LA COMPOSICIÓN CORPORAL EN RATAS HEMBRA WISTAR**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 12 de junio de 2017.

Dr. José Luis Quintanar Stephano
Co-Tutor de tesis

Dr. Gabriel Betanzos Cabrera
Co-Tutor de tesis

Dr. Andrés Quintanar Stephano
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Secretario Técnico

Agradecimientos

Estoy agradecido con Dios por la oportunidad de vivir y las circunstancias que han resultado en el ser humano que soy.

Una gratitud enorme a mi esposa Renata por caminar estos años a mi lado, por motivarme a salir adelante, por los desvelos y las horas robadas. Te agradezco por los buenos momentos y aventuras que hemos pasado juntos. Gracias infinitas por darme la alegría de ser papá de dos corazones implantados en el mío. ¡Gracias amor!

A mi Padre quien sobre todos los aspavientos tuvo las agallas de empujarnos hacia adelante en todos los aspectos de la vida, por quererme, cuidar de mí y enseñarme lecciones de vida invaluable, por heredarme el espíritu de lucha y el hambre de salir adelante. Un beso y un abrazo infinito con el alma donde quiera que estés Papá.

A mi Madre por los cuidados y consejos de toda la vida, por la paciencia y el empuje en los momentos difíciles. Te agradezco por el cariño inagotable que siempre me brindas y por todos los momentos inolvidables en familia vividos.

Le agradezco a mi hermano por el apoyo y motivación, por las historias vividas y el cariño recibido. Por la convivencia tan agradable que siempre compartimos.

A toda mi familia por compartir el sendero, por permitirme crecer en un ambiente de mutualidad y cohesión.

A mis suegros por el apoyo recibido desde el primer día que llegué a Aguascalientes, gracias por la convivencia familiar y las atenciones a mi familia, en especial a mi Padre.

Un profundo agradecimiento al Dr. José Luis Quintanar quien me recibió en su laboratorio ya hace algunos años y darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y en este proyecto. Por la atención, el trato y la convivencia siempre amable y de respeto dentro y fuera del laboratorio. Siempre le estaré agradecido.

Al Dr. Andrés Quintanar por su apoyo y enseñanzas académicas, por esa entrega y dedicación perpetua que son gran ejemplo, le agradezco su calidad humana y la orientación recibida.

Le agradezco al Dr. Gabriel Betanzos Cabrera por su tiempo y atención, por permitirme trabajar en su laboratorio y hacerme sentir en casa. Le agradezco su amistad y los buenos momentos dentro y fuera del laboratorio.

A todos los compañeros del laboratorio de neurofisiología que permanecen o transitoriamente me han brindado su apoyo no sólo en aspectos técnicos sino en compañía y buenos momentos. A Denisse, Irma, Moi, Beto, Christian, Irene, Chuy, Daniel, Chayito, Chío, Lili, Froy, Carmen, Tony, Frida, Caro, Javier, Sarahí, Óscar, Gigio y Lalo.

A los vecinos del edificio 202 por su atención y disponibilidad especialmente al laboratorio de Inmunología y Neuroinmunoendocrinología.

A mis compañeros de generación quienes aprecio y me brindaron su amistad dentro y fuera de la universidad, a Herson, Kerry, Marce, Sandra, Lalo, Carlos y Saúl.

Gracias a la Universidad Autónoma de Aguascalientes por la formación laboral, profesional y humana.

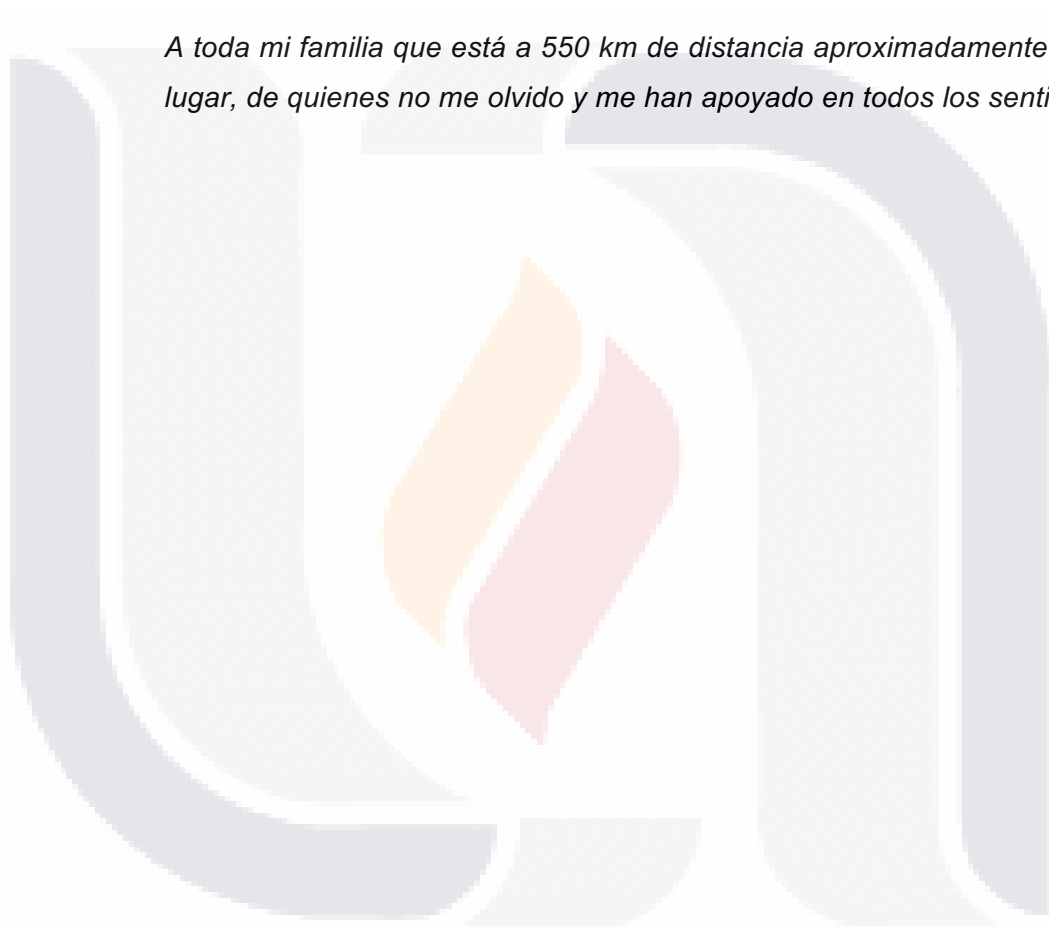
Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por los apoyos recibidos en mi formación académica.

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mi esposa Renata y a los mejores resultados obtenidos en estos años de doctorado, mis hijos Larissa y Adrián.

A mis padres y hermano que llevo siempre en mi mente y corazón.

A toda mi familia que está a 550 km de distancia aproximadamente de este lugar, de quienes no me olvido y me han apoyado en todos los sentidos.



Índice General

Índice general	1
Índice de tablas	4
Índice de figuras	5
Resumen	7
Abstract	8
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH)	10
1.2 Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas	10
1.3 Análogos de la GnRH	11
1.3.1 Acetato de Leuprolida	12
1.4 Composición corporal	12
1.4.1 Niveles de organización de la composición corporal	13
1.4.2 Determinación de la composición corporal a nivel molecular	14
1.5 Densitometría hidrostática	15
1.5.1 Cálculo del porcentaje de grasa corporal por DH	15
1.6 Crecimiento normal y composición corporal de la rata Wistar	16
1.7 Cambios en composición corporal asociados a tratamientos con GnRH	17
1.7.1 Papel orexigénico de la grelina	19
1.7.2 Leptina y su función neuroendocrina	20
1.7.3 Lipoproteínlipasa, descripción y función metabólica	22
2. HIPÓTESIS	24
3. OBJETIVO GENERAL	24
3.1 Objetivos específicos	24
4. MATERIAL Y MÉTODOS	25
4.1 Modelo animal y grupos de evaluación	25
4.1 Dosis de acetato de leuprolida	25
4.2 Períodos de evaluación	26

4.3	Determinación de indicadores murinométricos	26
4.4	Análisis de hidrodensitometría	27
4.4.1	Evaluación de composición corporal	28
4.5	Consumo de alimento y agua	29
4.5.1	Composición de la dieta	29
4.6	Procedimiento de obtención de muestras biológicas y disección	30
4.6.1	Análisis químico de grasa	30
4.7	Ensayos de química en sueros	32
4.8	Determinación de consumo oxígeno y producción de bióxido de carbono	32
4.8.1	Analizadores de gases	32
4.8.2	Descripción del circuito abierto	33
4.9	Expresión del RNAm de grelina, leptina y lipoproteínlipasa	35
4.10	Análisis estadístico	36
5.	RESULTADOS	37
5.1	Evaluaciones murinométricas	37
5.1.1	Peso corporal	37
5.1.2	Longitud naso-anal	39
5.1.3	Longitud nariz-cola	40
5.1.4	Índice Ponderal	42
5.1.5	Ganancia específica de peso (GEP)	44
5.2	Determinación de composición corporal	45
5.2.1	Porcentaje de masa grasa (MG) por ecuación de Siri	45
5.2.2	Masa libre de grasa (MLG) por ecuación de Siri	45
5.3	Determinación de composición corporal mediante indicadores murinométricos	49
5.3.1	Masa grasa por murinometría (MGm)	49
5.3.2	Masa libre de grasa por murinometría (MLGm)	51
5.4	Estudio de la composición corporal mediante disección	52
5.4.1	Peso de la piel	53
5.4.2	Peso de la carcasa	54
5.5	Análisis químico de lípidos totales en piel	56
5.6	Validación de los estudios de composición corporal	58
5.7	Estudio de intercambio respiratorio	61

5.7.1	Frecuencia de consumo de oxígeno	61
5.7.2	Frecuencia de producción de bióxido de carbono	61
5.7.3	Coeficiente de intercambio respiratorio	64
5.8	Ensayos bioquímicos	66
5.8.1	Determinación de glucosa	67
5.8.2	Determinación de triglicéridos	67
5.8.3	Determinación de colesterol total y HDL	67
5.9	Consumo de alimento	68
5.10	Consumo de agua	69
5.11	Análisis de RT-PCR	70
5.10.1	Expresión de RNAm de grelina	70
5.10.2	Expresión de RNAm de leptina	71
5.10.3	Expresión de RNAm de lipoproteínlipasa	73
6.	DISCUSIÓN	75
7.	CONCLUSIONES	83
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
9.	ANEXOS	95

Índice de tablas

Tabla 1.	Análogos sintéticos de la GnRH y sus modificaciones químicas	12
Tabla 2.	Niveles de organización de la composición corporal	13
Tabla 3.	Métodos de valoración de los diferentes niveles de composición corporal	14
Tabla 4.	Ecuaciones predictivas para masa grasa y masa libre de grasa	29
Tabla 5.	Análisis químico proximal de la dieta utilizada en el experimento	30
Tabla 6.	Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en el ensayo de RT-PCR	35
Tabla 7.	Porcentaje de incremento del peso inicial y el peso final	39
Tabla 8.	Diferencias de MGm para CTRL vs AL y OVX vs OVX+AL	50
Tabla 9.	Diferencias de MLGm para CTRL vs AL y OVX vs OVX+AL	52

Índice de figuras

Figura 1.	Relación entre el peso y edad de la rata	16
Figura 2.	Variación en peso en EAE en ratas Lewis	18
Figura 3.	Funciones fisiológicas de la grelina	19
Figura 4.	Efectos en SNC de la leptina	21
Figura 5.	Proceso de absorción de los triglicéridos de la dieta	23
Figura 6.	Cronograma experimental	26
Figura 7.	Esquema original del equipo de hidrodensitometría	27
Figura 8.	Equipo de hidrodensitometría elaborado en laboratorio	28
Figura 9.	Disección y extracción química de lípidos totales	31
Figura 10.	Cámara metabólica para determinación de VO_2 y VCO_2	33
Figura 11.	Ensayo de determinación de O_2 y CO_2	34
Figura 12.	Peso corporal	37
Figura 13.	Diferencia inicial y final de peso	38
Figura 14.	Longitud naso-anal todos los grupos experimentales	39
Figura 15.	Longitud naso-anal, A) CTRL y AL, B) OVX y OVX+AL	40
Figura 16.	Imagen representativa longitud nariz-cola	41
Figura 17.	Longitud nariz-cola	41
Figura 18.	Longitud nariz-cola, A) CTRL y AL, C) OVX y OVX+AL	42
Figura 19.	Índice Ponderal	43
Figura 20.	Ganancia específica de peso en gramos (GEP)	45
Figura 21.	Porcentaje MG (0 días) y MG (120 días)	46
Figura 22.	Porcentaje de masa grasa mediante la ecuación de Siri	47
Figura 23.	Porcentaje de MLG	48
Figura 24.	Masa grasa calculados por murinometría (MGm)	49
Figura 25.	Análisis comparativo de MGm para los grupos	50
Figura 26.	Análisis de MLGm para todos los grupos experimentales	51
Figura 27.	Comparativa de MGm CTRL vs AL y OVX vs OVX+AL	52
Figura 28.	Peso de la piel disecada	53
Figura 29.	Resultados de peso de la piel disecada	54
Figura 30.	Peso de la carcasa para todos los grupos	54
Figura 31.	Peso de la carcasa CTRL y AL; OVX vs OVX+AL	55

Figura 32.	Gramos de lípidos totales en piel	56
Figura 33.	Análisis de regresión, peso de la piel (g) y lípidos totales en piel (g)	57
Figura 33.	Análisis de regresión, extracto lipídico de piel (g) e índice ponderal	58
Figura 34.	Correlaciones de cálculo de MG	59
Figura 35.	Correlaciones de cálculo de MLG	60
Figura 36.	Frecuencia de consumo de oxígeno	62
Figura 37.	Frecuencia de consumo de oxígeno inicial-final	63
Figura 38.	Frecuencia de producción de CO ₂	63
Figura 39.	Frecuencia de producción de CO ₂ , CTRL vs AL y OVX vs OVX+AL	64
Figura 40.	Coeficiente de intercambio respiratorio	65
Figura 41.	Coeficiente de intercambio respiratorio inicial-final	66
Figura 42.	Concentración de glucosa en sangre (mg/dL)	66
Figura 43.	Concentración de triglicéridos en sangre (mg/dL)	67
Figura 44.	Concentración de colesterol total y HDL en sangre (mg/dL)	68
Figura 45.	Análisis de consumo de alimento	68
Figura 46.	Análisis de regresión entre peso corporal y consumo de alimento	69
Figura 47.	Análisis de consumo de agua	70
Figura 48.	Expresión del RNAm de grelina	71
Figura 49.	Productos de amplificación del RNAm de grelina	71
Figura 50.	Expresión del RNAm de leptina	72
Figura 51.	Productos de amplificación del RNAm de leptina	72
Figura 52.	Expresión del RNAm de LPL	73
Figura 53.	Productos de amplificación del RNAm de LPL	73

Resumen

El acetato de leuprolida es un agonista de la GnRH con efecto directo en la secreción de LH y FSH, capaz de generar aumentos de peso, sin embargo, no hay experimentos bien conducidos que estudien cambios en la composición corporal y los mecanismos de acción implícitos. La grelina y leptina son moléculas reguladoras del proceso hambre-saciedad, mientras que, la lipoproteín lipasa (LPL) es una enzima responsable del almacenamiento de ácidos grasos en adipocitos y células musculares. Posiblemente el acetato de leuprolida pueda afectar la expresión del RNAm de esos componentes. El objetivo del trabajo fue evaluar cambios en composición corporal, tasa metabólica y expresión del RNAm para grelina, leptina y LPL bajo un tratamiento a largo plazo con acetato de leuprolida en ratas Wistar hembra. Se formaron 4 grupos de ratas Wistar hembra de $146.8 \text{ g} \pm 3.8 \text{ g}$ con un grupo íntegro (AL) y uno ovariectomizado (OVX+AL), ambos tratados con $5 \text{ } \mu\text{g/Kg}$ de peso de acetato de leuprolida cada 72 h por 120 días. De igual forma dos grupos similares que los anteriores (CTRL y OVX) pero sólo con la aplicación del vehículo (0.9 % NaCl). Cada 20 días se analizó la composición corporal, análisis de carcasa, grasa bajo la piel, consumo de oxígeno y producción de CO_2 para conocer la tasa metabólica y adicionalmente un ensayo de PCR para medir expresión de RNAm de grelina, leptina y LPL. El grupo OVX resultó con un 51 % de incremento en peso mientras que el grupo AL con 47 %, los grupos OVX+AL y CTRL 38 y 33% respectivamente comparado con el inicio. La masa grasa resultó un 14 % por encima para AL vs CTRL 19 % para OVX vs OVX+AL, la masa libre de grasa resultó mayor en AL comparado con CTRL en tanto que, OVX y OVX+AL compartieron resultados muy similares. Al final del experimento la expresión de grelina resultó un 75 % más alta en el grupo AL que OVX+AL mientras que el grupo CTRL resultó con un 25 % menos comparado con OVX. La expresión del RNAm de LPL resultó en un 48 % más alta para el grupo AL comparado con OVX+AL. Interesantemente El grupo CTRL tuvo una expresión 51 % más baja comparado con el grupo OVX. No se presentaron diferencias importantes en el ensayo para leptina. El acetato de leuprolida puede modificar el peso, la composición corporal, la tasa metabólica y generar cambios importantes en la expresión del RNAm de LPL, y grelina, lo cual significa que posibles mecanismos orexigénicos y de señalización de almacenaje de ácidos grasos estén involucrados. Además, los resultados indican un efecto directo del acetato de leuprolida no importando la presencia o ausencia de hormonas gonadales sobre el peso y la composición corporal.

Abstract

Leuprolide acetate a GnRH agonist has direct effect on LH and FSH secretion and causes changes in body weight in experimental and clinical trials; however, there are no studies properly directed on body composition analysis and possible mechanisms implied. Ghrelin, an orexigenic peptide and leptin are associated to modulate hunger-satiety process, while lipoproteinlipase (LPL) an enzyme that can facilitate fatty acid storage in muscle and adipose tissues. Possibly mRNA expression of that components could be modified by leuprolide acetate action.

The aim of this work was to evaluate changes in body composition, metabolic rate and mRNA expression of ghrelin, leptin and lipoproteinlipase under a long-term leuprolide acetate experiment in female Wistar rats.

Female Wistar rats ($146.8 \text{ g} \pm 3.8$) were used, forming the following groups: a non-ovariectomized group (LA) and ovariectomized group (OVX+LA) both treated with a leuprolide acetate dose every 72 hours for 120 days ($5 \text{ } \mu\text{g/Kg}$). Likewise, another non-ovariectomized (CTRL) and one ovariectomized (OVX) groups were formed, which received only an equivalent volume of vehicle (0.9% NaCl). Every 20 days body composition was assessed, carcass analysis and chemical analysis of fat mass under skin, oxygen uptake and CO_2 production to measure metabolic rate and additionally RT-PCR was performed to measure mRNA expression of ghrelin, leptin and LPL.

OVX group had an increase in weight by 51% while the LA group by 47%, OVX+LA and CTRL 38% and 33%, respectively compared to baseline. The analysis of fat mass (FM) was 14% higher for LA vs CTRL and 19% higher for OVX vs OVX+LA, fat-free mass (FFM) was higher in the LA group compared to CTRL while OVX and OVX+LA showed a pattern very similar for both components. At the end of the experiment the mRNA expression of ghrelin in the AL group was 75% higher than OVX+LA while CTRL group had an expression of 25% lower compared to OVX. The LPL mRNA expression was 48% higher for LA compared to OVX+LA group. Interestingly CTRL group had an expression of 51% lower compared to the OVX group. It wasn't differences in leptin mRNA assay.

Leuprolide acetate can modify weigh; body composition, metabolic rates and generates significant changes in mRNA expression of LPL and ghrelin, which means that mechanisms of orexigenic signaling and fatty acid storage maybe are implied. In addition, the results indicate a direct effect of LA regardless of the presence or absence of gonadal hormones on body weight and composition

1. Introducción

En la actualidad existen diferentes enfoques de estudio acerca de las moléculas responsables de gasto y almacén de energía, desde la búsqueda de tratar de regular estas señales con la finalidad de encontrar un equilibrio que permita brindar salud en el ser humano, evitando problemas o desordenes metabólicos hasta la contraparte en la que se busca manipular este balance energético en algunos mamíferos de forma positiva de tal forma que resulte ser benéfico para los grandes productores pecuarios obteniendo altos rendimientos de carne y subproductos con valor económico.

La regulación metabólica consiste en una compleja interacción entre diferentes factores que va desde la expresión génica muchas veces afectada por factores ambientales y la producción específica de moléculas a nivel bioquímico que desempeñan un papel fundamental en el anabolismo y catabolismo de diferentes componentes, que al final, mediante la interacción de estos se regula la tasa metabólica manteniendo la homeostasis. De manera general se han identificado algunos péptidos y proteínas que tienen la capacidad de regular el apetito dependiendo de su concentración y acción en órganos blanco a los cuales se les ha llamado proteínas o péptidos orexigénicos y anorexigénicos.

Posiblemente uno de los péptidos involucrados en este proceso sea la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y de ser así su función aún no está bien descrita en este papel, ya sea activando a otras moléculas responsables de ingesta de alimento o bien inhibiendo aquellas moléculas supresoras del apetito. Lo que es un hecho es que la GnRH y sus análogos han tenido diferentes campos de aplicación terapéutica en la medicina, desde el área de la ginecología, pediatría, urología y neurología. Desde su descubrimiento a inicios de la década de los 70's se ha demostrado que la GnRH y sus análogos han sido utilizados para regular e influir sobre el eje hipotálamo-pituitario-gonadal en dos distintas aplicaciones terapéuticas. La primera para influir y restaurar el potencial reproductivo en hombre y mujeres con alteraciones en la secreción de GnRH y la segunda mediante su administración prolongada produciendo una desensibilización de la GnRH endógena, lo cual significa la anulación funcional del eje reproductivo. Esta desensibilización bioquímica inducida por agonistas de GnRH es un método seguro y reversible que ayuda a contrarrestar enfermedades como la endometriosis y fibromas en mujeres, cáncer de próstata en hombre y pubertad precoz para ambos géneros (Conn & Crowley, 1994).

1.1 Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH)

La hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) pertenece a un grupo de neuropéptidos originalmente descubiertos y aislados como factores de origen hipotalámico que ejerce su función controlando secreciones de la hipófisis anterior. La función de la GnRH mejor descrita es la de regular la síntesis y liberación de gonadotropina a nivel pituitario (Schneider, Tomek, & Gründker, 2006). La GnRH es un decapeptido (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-HH₂) que tiene un papel importante en el proceso de reproducción (Amoss et al., 1971; Matsuo, Baba, Nair, Arimura, & Schally, 1971). Es producida por células neurosecretoras y liberada de una forma pulsátil a la circulación porta hipotálamo-hipofisiaria, mediante la cual es transportada a la región anterior de la glándula hipófisis (Cheng & Leung, 2005). En hipófisis esta se une a su receptor transmembranal (GnRHr) expresado en células gonadotrópicas para estimular la síntesis y liberación de dos gonadotropinas, hormona luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH), las cuales a su vez regulan la gametogénesis y esteroidogénesis gonadal (Counis et al., 2009). A su vez, la liberación de GnRH está regulada por la síntesis de estrógenos y testosterona que en concentraciones significantes logran reducir esta liberación y es de interés mencionar que en animales castrados que son tratados con estrógenos y testosterona de forma prolongada se ha logrado inhibir la secreción de GnRH (Clarke & Pompolo, 2005). En adición a esto la GnRH es capaz de modular la secreción autócrina y paracrina en otros compartimentos extrapituitarios, como el ovario, placenta, útero y sistema inmune (Casañ, Raga, Bonilla-Musoles, & Polan, 2000; Chen et al., 2002).

1.2 Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas

El eje hipotálamo-hipófisis es uno de los principales sistemas de control y regulación hormonal. El hipotálamo es una estructura del sistema nervioso central (SNC) ubicada en la base del cerebro en la porción anterior del diencefalo. Además de establecer múltiples conexiones con otras estructuras del cerebro, mantiene una estrecha relación con la hipófisis a través del tallo hipofisario. La hipófisis es una estructura oval localizada detrás del quiasma óptico en una cavidad del hueso esfenoides denominada silla turca. La hipófisis está compuesta de dos partes, cada una de ellas con un origen embriológico diferente: la hipófisis anterior o adenohipófisis proviene de una invaginación ectodérmica bucofaríngea en tanto que la hipófisis posterior o neurohipófisis se deriva de una prolongación del tercer ventrículo y conserva su origen nervioso toda la vida. Los axones neurohipofisarios, cuyos

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

cuerpos celulares se encuentran en los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo, terminan en capilares conectados a la red vascular para después alcanzar la circulación general. La neurohipófisis se encarga de la secreción de oxitocina y vasopresina, la primera incrementa la contracción uterina durante el parto y la contracción de células mioepiteliales de los conductos mamarios durante la lactancia, la vasopresina incrementa la reabsorción de agua en el riñón y tiene propiedades vasoconstrictoras. La adenohipófisis es controlada en cuanto a su secreción por hormonas del hipotálamo. Recibe un abundante riego sanguíneo a través de la red vascular del sistema porta-hipofisiario. Las células de la adenohipófisis se clasifican de acuerdo con el tipo de hormona que producen, lactótrofos que secretan prolactina (PRL), somatótrofos hormona del crecimiento (GH); tirótrofos tirotropina (TSH); los gonadótrofos hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH); los corticótrofos hormona adrenocorticotrópica o corticotropina (ACTH) (*Texto de neurociencias cognitivas*, 2001).

1. 3 Análogos de la GnRH

De forma natural se han identificado poco más de veinte variantes de la GnRH en algunas especies de vertebrados y están ampliamente distribuidos en diferentes tejidos lo cual sugiere funciones específicas (Millar, 2005). La principal modificación o variante entre estos péptidos corresponden principalmente al aminoácido glicina y su posición terminal de sus secuencias comparada con la GnRH original. Por otra parte también existen análogos sintéticos agonistas y antagonistas los cuales pueden tener mayor efecto que la propia GnRH endógena (Conn & Crowley, 1994). El uso de diferentes análogos de la GnRH se asocia con tratamientos de tipo oncológico y de fertilidad tanto en humanos como otras especies de mamíferos, en este sentido la administración repetida de GnRH puede llegar a desencadenar una saturación de los gonadótrofos impidiendo que estos a su vez realicen de forma adecuada la secreción de estrógenos y testosterona por supresión gonadal, propiedad que ha sido aprovechada con fines terapéuticos (Belchetz, Plant, Nakai, Keogh, & Knobil, 1978). La principal modificación que suelen tener estos análogos a nivel de su estructura química de estos, es la sustitución del aminoácido glicina de la secuencia original y en algunos casos la adición de etilamida en la posición terminal (Tabla 1).

Tabla 1. Diferentes análogos sintéticos de la GnRH y sus modificaciones químicas respecto al péptido de GnRH original.

Nombre	Secuencia de aminoácidos	
GnRH	pyroGlu – His – Trp – Ser – Tyr – Gly – Leu – Arg – Pro – Gly –NH ₂	
Decapeptil	d-Trp	-EtNH ₂
Leuprolida	d-Leu	-EtNH ₂
Buserelina	d-Leu (tBu)	-EtNH ₂
Nafarelina	d-Nal (2)	-EtNH ₂
Deslorelina	d-Trp	-EtNH ₂
Histrelina	d-His (ImBzl)	-EtNH ₂
Leuprorelina	d-Leu	-EtNH ₂
Goserelina	d-Ser (Bu)	-NH ₂

1.3.1 Acetato de Leuprolida

El acetato de leuprolida es un análogo sintético de la GnRH, el cual, está constituido por una cadena de nueve aminoácidos con la inserción de un aminoácido D-Leucina en la posición número 6 de la molécula de GnRH original. Se le considera un súper agonista debido a la alta afinidad que posee a los receptores de GnRH (Conn & Crowley, 1994), tomando en cuenta su prolongado efecto biológico (~ 3 h contra 3–4 min comparado con la GnRH endógena) (Periti, Mazzei, & Mini, 2002; Sennello et al., 1986).

La biodisponibilidad de este análogo es similar si la vía de administración es subcutánea como intramuscular. Se especula que el acetato de leuprolide no tiene interacciones farmacológicas, a pesar de que no hay estudios formales en este sentido. Este agonista así como la propia GnRH han sido empleados con diversos fines terapéuticos y experimentales, se han estudiado en su papel como factor neurotrófico en encefalomiелitis autoinmune experimental para el caso del agonista (Guzmán-Soto, Salinas, Hernández-Jasso, & Quintanar, 2012a) y lesión medular en ambos compuestos (Calderón-Vallejo & Quintanar, 2012a; Díaz Galindo et al., 2015).

1.4 Composición corporal

El estudio de la composición corporal en el humano consiste en determinar los diferentes componentes y compartimentos del organismo y las relaciones cuantitativas entre ellos, esto bajo un estado de salud optimo pero también en estados patológicos, trata de evaluar de igual forma, crecimiento y desarrollo, maduración y envejecimiento (Hernandez, 2010). La composición corporal tiene diferentes formas de medirse ya sea *in*

vitro, realizando disección de un cadáver o *in vivo*, mediante estimaciones y técnicas especiales. Estas técnicas han permitido estudiar la composición corporal desde el modelo más simple que divide al cuerpo humano en dos compartimentos, grasa y libre de grasa, hasta modelos multicompartimentales que intentan determinar lo más exactamente posible la composición del cuerpo humano, desde un punto de vista clínico y experimental.

1.4.1 Niveles de organización de la composición corporal

Si bien la masa corporal puede diferenciarse de dos simples formas como masa libre de grasa y masa grasa, hay que considerar que la masa libre de grasa aún puede subdividirse en más compartimentos (Proteína Visceral, Músculo Esquelético, Proteínas Plasmáticas, Agua Intracelular y Extracelular, así como Piel y Esqueleto). Actualmente el modelo más aceptado para determinar los niveles de organización de la composición corporal es el propuesto por Wang *et al.*, 1992, quienes dividen la composición del cuerpo humano en cinco niveles-compartimentos: nivel I - atómico, nivel II - molecular, nivel III – celular, nivel IV – tejidos y nivel V – cuerpo completo (tabla 2), y a través de los cuales puede abordarse el estudio de la composición corporal ya que la suma de cada uno de los componentes de cada nivel, corresponderá a la masa corporal.

Tabla 2. Los cinco niveles de organización de la composición corporal. FEC (fluidos extracelulares) y SEC (Sólidos extracelulares)

Nivel I	Nivel II	Nivel III	Nivel IV	Nivel V
Atómico	Molecular	Celular	Tejidos	C. completo
Hidrógeno	Proteína	FEC	Sanguíneo	Regiones del cuerpo humano
Carbono	Lípidos	SEC	Óseo	
Oxígeno	Agua	Células	Adiposo	
Otros	Otros		Músculo esquelético	

* (Z. M. Wang, Pierson, & Heymsfield, 1992)

De tal forma que el nivel I – atómico incluye los elementos químicos como el oxígeno, hidrógeno, carbono, nitrógeno, calcio y fósforo, el nivel II – molecular comprende los compartimentos moleculares como agua, proteína, glucógeno, minerales y grasa, el nivel III – celular está constituido por células, fluidos extracelulares (FEC) y sólidos extracelulares (SEC), el nivel IV – tejidos se compone como su nombre lo indica por todos los tejidos, órganos y sistemas y por último el nivel V – cuerpo completo el cual puede

estudiar el cuerpo humano dividiéndolo en regiones como extremidades, tronco y cabeza (S. Heymsfield, 2005). Es importante saber que el estudio de la composición corporal está organizado en tres áreas que se interrelacionan y las cuales son: reglas y modelos de determinación de composición corporal, metodología y variación en la composición corporal. Cada nivel tiene sus diferentes métodos de valoración y el desarrollo y mejora de los mismos continua día con día (Tabla 3).

Tabla 3. Métodos de valoración de los diferentes niveles de composición corporal.*

Nivel	Métodos de determinación desarrollados y/o mejorados	Otros métodos
Atómico	Análisis de activación de neutrones	Conteo de trazador diluido de ⁴⁰ K en cuerpo completo
Molecular	Bioimpedancia eléctrica, energía dual, absorciometría de rayos X, modelos multicompartimentales	Peso hidrostático, interacción infrarroja, trazador y dilución de gas
Celular, tejidos y sistemas	Tomografía axial computarizada (TAC), imagenología de resonancia magnética.	Dilución de trazador, ultrasonido, creatinina y 3-metil histidina de 24 hr.
Cuerpo completo		Antropometría

* (B. Heymsfield, Wang, Baumgartner, & Ross, 1997)

1.4.2 Determinación de la composición corporal a nivel molecular

El estudio de los componentes de la composición corporal a nivel molecular es de gran utilidad en investigación a diferentes niveles, ya se valorando efectos nutricionales de algún tratamiento, determinación de energía, proteína y metabolismo lipídico, homeostasis mineral ósea y balance hídrico. Dentro de este nivel se hace dos tipos de distinciones por una parte la masa grasa que está compuesta por el total de lípidos esenciales y no esenciales y por otra parte la masa libre de grasa, la cual se distinguen subcompartimentos como lo son: el agua corporal total (intracelular y extracelular), proteína corporal total, glucógeno y minerales óseos (S. B. Heymsfield, Wang, Baumgartner, & Ross, 1997).

Este modelo se puede expresar por la siguiente formula:

$$BW = FM + TW + TBPr + OM + STM$$

Dónde: *BW* es igual al peso corporal total, *FM* es igual a la masa grasa, *TW* es igual al agua corporal total, *TBPr* es la proteína corporal total, *OM* son los minerales óseos y *STM* los minerales encontrados en los tejidos blandos (Ellis, 2000).

1.5 Densitometría hidrostática

Una de las principales características de los componentes a nivel molecular, visto desde una perspectiva metodológica es su densidad física. Esto es porque la densidad de todo el cuerpo es relativamente fácil de medir con precisión en la mayoría de los niños y adultos sanos (S. Heymsfield, 2005) además, muchos modelos del nivel molecular están basados en la densidad o cercanía al volumen corporal. La densitometría hidrostática (DH) se considera como el método de referencia para la determinación de la masa grasa *in vivo*, esta técnica se utiliza frecuentemente para la validación de técnicas como bioimpedancia eléctrica, absorciometría fotónica dual y demás técnicas destinadas a valorar la composición corporal *in vivo*. En humanos la densidad corporal (DC) puede calcularse a partir del peso [en seco (P)], el peso hidrostático (P_H), el volumen residual pulmonar (VR) y el volumen gastrointestinal (VGI) del siguiente modo:

$$PC = P / (P - P_H - VR - VGI)$$

P_H y VR se determinan simultáneamente con el sujeto completamente sumergido y en espiración máxima, y se asume un valor de 100 mL para el VGI (Brožek & Henschel, 1961). A partir de la densidad corporal se puede calcular el porcentaje de grasa asumiendo que el peso corporal es la suma de dos compartimentos [Masa grasa (MG) y masa libre de grasa (MLG)] con densidades fijas y conocidas, lo que implica que los componentes mayores de la MLG (hueso, agua y proteínas) son sumatorios, conocidos y constantes en todos los individuos (S. B. Heymsfield et al., 1990). La DH no requiere ajuste experimental siempre y cuando se cumplan las asunciones anteriores, sin embargo, la mala mineralización, desnutrición proteica o alteraciones hídricas pueden afectar a la densidad de la MLG y por ende la estimación de la MG (Modlesky et al., 1996).

1.5.1 Cálculo del porcentaje de grasa corporal por DH

La estimación del porcentaje de grasa corporal (%MG) a partir de la densidad se puede realizar mediante la ecuación de Siri, la cual asume que la densidad de la masa

grasa (D_{MG}) y la densidad de la masa libre de grasa (D_{MLG}) es de 0.9 y 1.1 g/mL respectivamente (Siri, 1993). El valor de 1.1 g/mL para D_{MLG} se basa tomando en cuenta, las densidades asumidas y contribuciones fraccionales de los componentes químicos principales de la masa libre de grasa. Respecto a los datos obtenidos de las sumatorias hechas por Brozek et al. Los promedios de agua, minerales y proteína para la MLG son de 73.8, 6.8 y 19.4 % respectivamente con densidades de 0.9937, 3.038 y 1.34 g/mL, respectivamente a una temperatura de 36 °C. Calcular el porcentaje de grasa corporal por este método es muy confiable ya que se ha tenido resultados constantes en diferentes ensayos realizados con una desviación estándar de 0.0007 g/mL dentro de estudios entre individuos o bien en diferentes depósitos dentro del cuerpo humano (Fidanza, Keys, & Anderson, 1953).

1.6 Crecimiento normal y composición corporal de la rata Wistar

El tamaño de una rata de laboratorio está usualmente expresado en términos del peso corporal. La tasa de crecimiento depende no solo de la cepa, sino también de la calidad y disponibilidad de comida, factores ambientales como la temperatura y la situación social (Fig. 1).

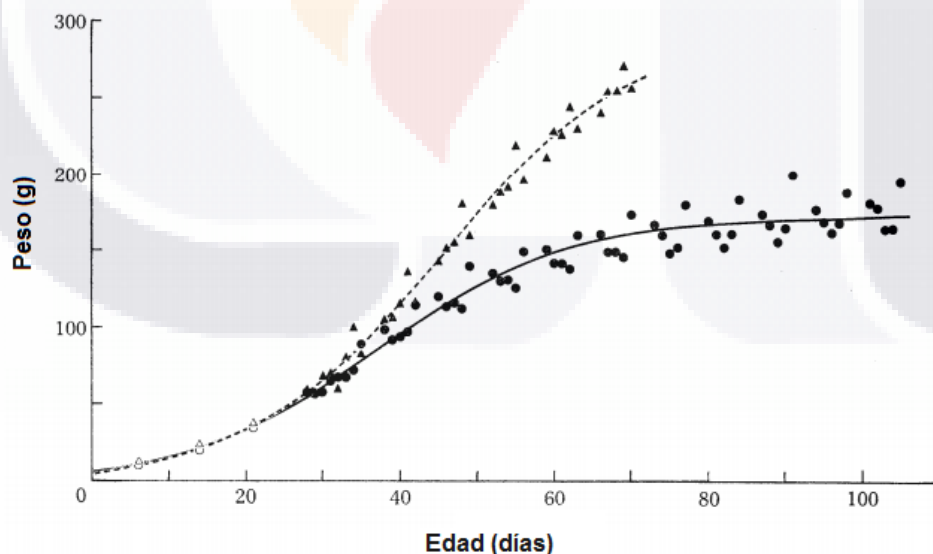


Figura 1. Relación entre el peso y edad de la rata Wistar macho (triángulos) y hembra (círculos) en condiciones normales. _____ línea de las hembras; - - - - - línea de los machos. Modificado de (Pahl, 1969).

Las ratas macho de laboratorio están propensas a desarrollar obesidad y pueden alcanzar pesos cercanos a los 800 g. (Koolhaas, 2010). El tamaño puede ser determinado empleando parámetros morfológicos tales como la longitud del cuerpo y de la cola. La longitud del cuerpo se mide desde la mitad de la nariz hasta la altura del orificio anal y la longitud de la cola desde el orificio anal y la punta de la cola. La expectativa de vida para la rata de laboratorio (Cepa Wistar) es cercana a los 1200 días (3.2 años) para los machos y 1400 días (3.8 años) para las hembras. Teniendo una media en días de expectativa de vida de 850 y 900 días para machos y hembras respectivamente. Aunque existen diversos estudios de análisis de la composición corporal en ratas, existen pocas referencias de datos promedios para determinar composición corporal del animal en condiciones normales, ya que tales determinaciones están en función del modelo y/o experimento a realizar y la variabilidad de los datos puede ser grande. Es importante mencionar que cada experimento planteado en este sentido, debe considerar siempre grupos controles que le permitan evaluar los cambios en estudios longitudinales respecto a los grupos problema.

1.7 Cambios en composición corporal asociados a tratamientos con GnRH

Como resultado a los diferentes usos terapéuticos y tratamientos a partir de análogos de la GnRH se han reportado un gran número de estudios en los cuales los cambios en la composición corporal se hacen presentes, normalmente como una ganancia de peso corporal como resultado concomitante del tratamiento con análogos, se ha reportado este fenómeno en tratamiento de pubertad precoz (Aguiar et al., 2006; Carel, Eugster, Rogol, Ghizzoni, & Palmert, 2009; Chiumello et al., 2000), tratamiento de endometriosis (Schlaff, Carson, Luciano, Ross, & Bergqvist, 2006; Szczurowicz & Wydra, 1996), cáncer de próstata (Smith et al., 2002; Smith, 2004a) y recientemente se publicó un estudio en donde se demuestra el papel de la GnRH como factor neurotrófico en la recuperación de un modelo animal con lesión medular inducida en el cual se reporta ganancia de peso debido al tratamiento con GnRH (Calderón-Vallejo & Quintanar, 2012b). Este fenómeno también se reporta en animales castrados con encefalopatía autoinmune experimental que fueron tratados con acetato de leuprolida un análogo de la GnRH [Fig.2 (Guzmán-Soto, Salinas, Hernández-Jasso, & Quintanar, 2012b)].

Así bien es claro que este fenómeno está bien conservado aún en diferentes especies, sin embargo, no existen reportes específicamente con el objetivo principal de evaluar cambios en la composición corporal y entender el mecanismo que lo causa bajo un esquema de tratamiento con un análogo de GnRH.

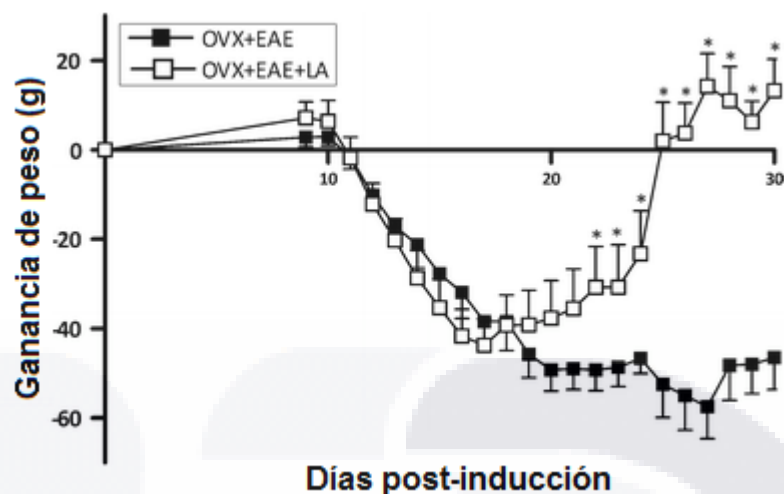


Figura 2. Variación en peso en encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) en ratas Lewis tratadas con acetato de leuprolida (cuadros vacíos) y no tratadas (cuadros llenos) Modificado de (Guzmán-Soto et al., 2012b)

En las últimas tres décadas se ha tratado de proponer diferentes enfoques para dilucidar la relación entre el balance energético y la adipogénesis con base en la señales endócrinas y metabólicas. En este sentido, se sabe que el desarrollo de la adipogénesis en condiciones no patológicas está vinculado a un alto consumo de alimento y a una reducción considerable de la actividad física. Bajo estos conceptos compuestos como grelina y leptina, péptidos con actividad orexigénica y anorexigénica respectivamente, juegan un papel fundamental actuando a nivel del sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP), cumpliendo funciones como el control de la ingesta, peso corporal, adiposidad y metabolismo de la glucosa (Müller et al., 2015). Por otra parte, la lipoproteinlipasa es una enzima con diferentes actividades fisiológicas y una de ellas es suministrar de ácidos grasos a diferentes tejidos para su almacenaje o bien su oxidación inmediata (H. Wang & Eckel, 2009). Cualquier cambio en la expresión de estos compuestos puede verse afectado simplemente por etapas fisiológicas del organismo pero también, derivado de tratamientos hormonales los cuales, podrían favorecer el incremento o reducción de la ingesta provocando cambios en la composición corporal. De tal forma que independientemente donde se dirija el tratamiento terapéutico con GnRH o sus análogos, es de vital importancia estudiar los efectos que puede tener este tipo de tratamientos sobre los cambios en la composición corporal y así manejar forma los posibles efectos indeseados o incluso sacar provecho de ellos.

1.7.1 Papel orexigénico de la grelina

Originalmente la grelina fue descubierta como un péptido de origen gastrointestinal en forma de un ligando endógeno para el receptor secretagogo de la hormona del crecimiento (GHSR), capaz de estimular y liberar hormona del crecimiento (GH) desde la hipófisis anterior (Kojima et al., 1999). Posteriormente se describió su participación en procesos de ingesta, modificación del peso corporal, adipogénesis y metabolismo de la glucosa mediante procesos metabólicos que incluyen la activación de circuitos neurales orexigénicos (Nakazato et al., 2001; Matthias Tschöp, Smiley, & Heiman, 2000). A partir de estos primeros reportes este péptido ha sido estudiado en funciones a nivel del SNC y SNP que incluyen motilidad gástrica, secreción gástrica, regulación del sueño, sensación de hambre, metabolismo de la glucosa, supresión termogénica del tejido adiposo pardo, protección contra la atrofia muscular y mejora de funciones cardiovasculares tales como vasodilatación y contractilidad del músculo cardíaco (Müller et al., 2015), (Fig. 3).

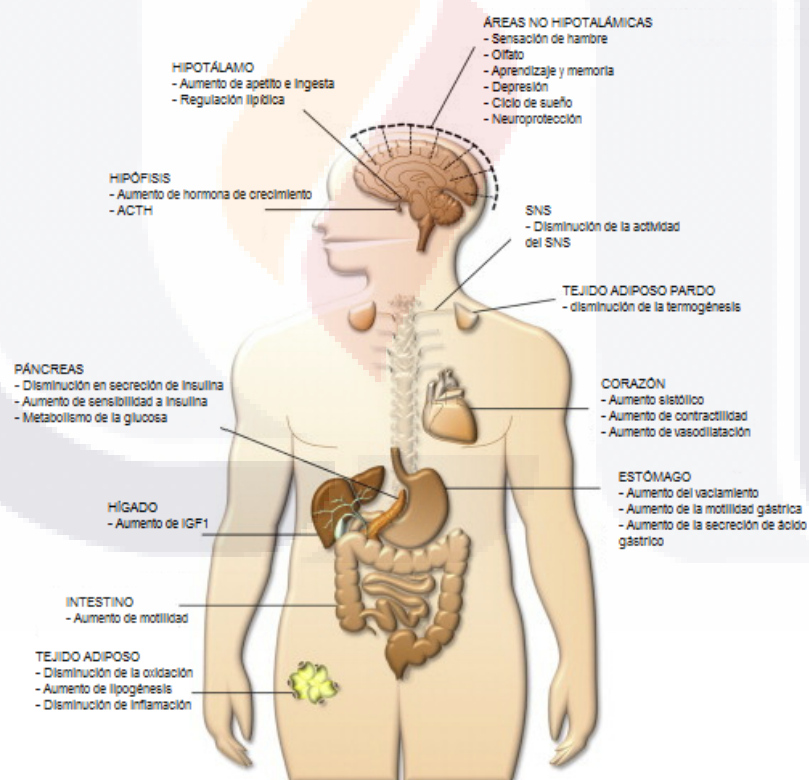


Figura 3. Efectos fisiológicos que ejerce la grelina en los diferentes tejidos involucrados en el proceso de regulación orexigénica. Modificado de (Müller et al., 2015).

El papel mayormente aceptado de los efectos fisiológicos de la grelina como péptido orexigénico es que actúa precisamente en la iniciación del hambre que se produce mediante señalización gastrointestinal al SNC con el desencadenamiento de procesos de ingesta y regulación del gasto energético (Cowley et al., 2003; Cummings, 2006). Adicionalmente a estas funciones, la grelina es producida y liberada desde las glándulas oxínticas del fondo gástrico y su concentración más alta en torrente sanguíneo está relacionada a sensaciones intensas de hambre (M. Tschöp et al., 2001), su receptor está localizado en las neuronas hipotalámicas que regulan la ingesta y saciedad (Guan et al., 1997).

Actualmente se sabe que los tratamientos con GnRH y sus análogos causan modificaciones en el peso de sujetos en tratamiento pero también en modelos experimentales y recientemente se ha descubierto que la grelina pudiera tener un papel más complejo en la regulación del apetito y metabolismo. Es probable que pueda existir una respuesta anormal de la grelina bajo efectos de análogos de GnRH.

1.7.2 Leptina y su función neuroendócrina

La leptina es un producto de 167 aminoácidos fue originalmente descubierto a través de la clonación posicional de ratones ob/ob, un modelo de obesidad en ratones encontrado por serendipia en los Laboratorios Jackson (Zhang et al., 1994), los cuales, tenían una mutación del gen de leptina causándoles una deficiencia de la misma que a su vez, les originaba hiperfagia, obesidad extrema, diabetes, anormalidades neuroendócrinas e infertilidad. Este compuesto se secreta principalmente por el tejido adiposo blanco y los niveles de esta hormona está positivamente correlacionada con la cantidad de masa grasa (Licinio et al., 1997). Al igual que otras hormonas, la leptina es secretada de forma pulsátil y sus niveles más altos se han detectado a tempranas horas o cercana la noche (Sinha et al., 1996). Esta hormona actúa mediante la unión de receptores de leptina (ObRs) expresados tanto en SNC y SNP. Estos receptores a su vez permiten el cruce de leptina a través de la barrera hematoencefálica y su acción directa a nivel hipotalámico el cual, es un sitio importante de regulación energética y función neuroendócrina (Elmqvist, Bjørnbæk, Ahima, Flier, & Saper, 1998). El nivel de leptina circulante sirve como un indicador para las reservas de energía y dirige el sistema nervioso central para ajustar la ingesta de alimentos y el gasto de energía en consecuencia. La leptina ejerce efectos inmediatos actuando sobre el cerebro para regular el apetito (Fig. 4). A través de la unión del receptor ObRb en el hipotálamo, la leptina activa un circuito neural complejo que comprende activación

neuropéptidos anorexígenos (es decir, que disminuyen el apetito) y orexigénicos (es decir, estimulantes del apetito) para controlar la ingesta de alimentos. Fuera del hipotálamo, la leptina interactúa con el sistema mesolímbico dopaminérgico, que está implicado en comportamiento de motivación y recompensa hacia la alimentación, y el núcleo del tracto solitario del tronco encefálico para contribuir a la saciedad (Robertson, Leininger, & Myers, 2008).

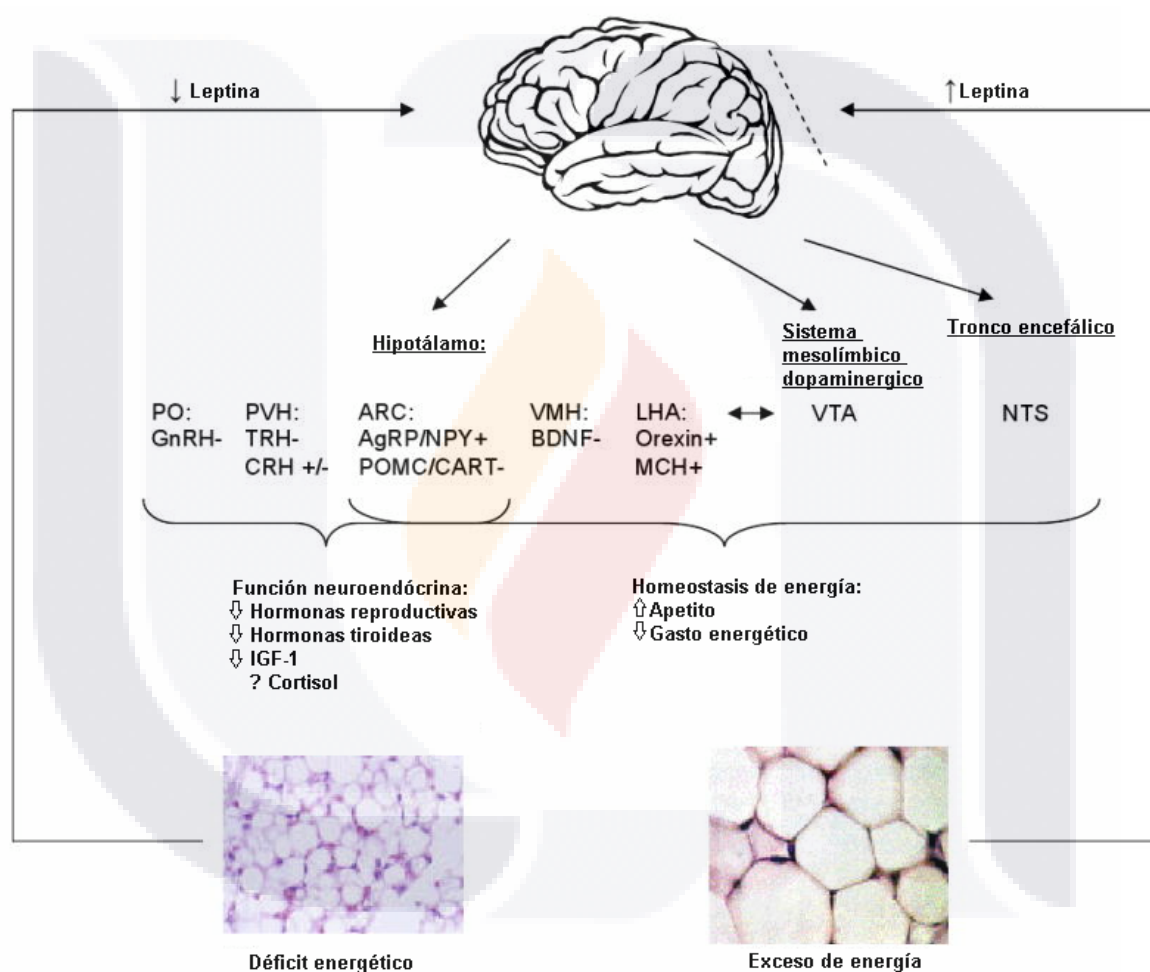


Figura 4. Efectos centrales de la leptina en estados de exceso de energía y deficiencia. Los estados de exceso de energía se asocian con hiperleptinemia, pero el hipotálamo puede ser resistente o tolerante a los efectos del aumento de la leptina, representado por la línea discontinua. La deficiencia energética da lugar a hipoleptinemia. Como resultado, se activa un circuito neural complejo que comprende señales orexigénicas y anorexigénicas para aumentar la ingesta de alimentos. Modificado de (Robertson et al., 2008).

En respuesta al ayuno, los niveles de leptina caen rápidamente sin cambios aparentes de masa grasa (Chan et al., 2003), desencadenando respuestas neuroendócrinas a una privación aguda energética, esta respuesta puede incluir disminución de los niveles

hormonas reproductivas lo cual evita la función reproductiva o bien gestacional (procesos que requieren energía), disminuyen hormonas tiroideas lo cual implica una reducción de las tasas metabólicas, incrementan los niveles de hormona de crecimiento para movilizar reservas energéticas y disminuye el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) lo cual ralentiza procesos de crecimiento con la finalidad de ahorrar energía (Ahima et al., 1996). Se ha reportado que la administración de leptina in vitro promueve la liberación de GnRH-LH (Yu et al., 1997), sin embargo, aún no está claro si pudiera existir un efecto en sentido opuesto. Dada la cercanía de los sitios de acción de la leptina y GnRH es posible plantear que ambas hormonas juegan un papel importante en la regulación del balance energético y posiblemente exista modificación en los niveles de expresión de leptina bajo administración de GnRH o bien sus análogos.

1.7.3 Lipoproteínlipasa, descripción y función metabólica

La lipoproteínlipasa (LPL) es una enzima de 55 kDa sintetizada en adipocitos y células musculares y liberada a circulación donde mediante estructuras de glicosaminoglicanos se une a la superficie luminal de los capilares (Santamarina-Fojo & Brewer, 1994). En presencia de su cofactor apolipoproteína (apo) CII, la LPL capta los triglicéridos presentes en quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad que se encuentran en circulación y los hidroliza hasta ácidos grasos libres, los cuales, pueden ser utilizados como fuente inmediata de energía o se reesterifican para su almacenaje a nivel celular (Havel, Kane, & Kashyap, 1973), (Fig. 5). Se ha demostrado que la LPL a parte de su función principal, participa en otros procesos fisiológicos y fisiopatológicos, la expresión anormal de esta enzima, está relacionada con la aparición de aterosclerosis, obesidad, diabetes, quilomicronemia, enfermedad de Alzheimer y caquexia (Mead, Irvine, & Ramji, 2002).

La LPL tiene una distribución en muchos tejidos y es regulada mediante concentraciones de nutrientes y hormonas. Las hormonas tiroideas y los glucocorticoides de igual forma juegan un papel en la producción y regulación de la LPL. En la glándula mamaria, la actividad de la LPL se incrementa en la etapa final del embarazo y la lactancia, y aparentemente. En tejido adiposo pardo, la exposición al frío estimula la expresión de la LPL por actividad de procesos que implican estimulación B- adrenérgica. Tanto el estrés crónico como agudo disminuye la actividad en tejido adiposo blanco pero estimula su actividad a través de catecolaminas en músculo cardíaco y esquelético al igual que en glándulas suprarrenales (H. Wang & Eckel, 2009).

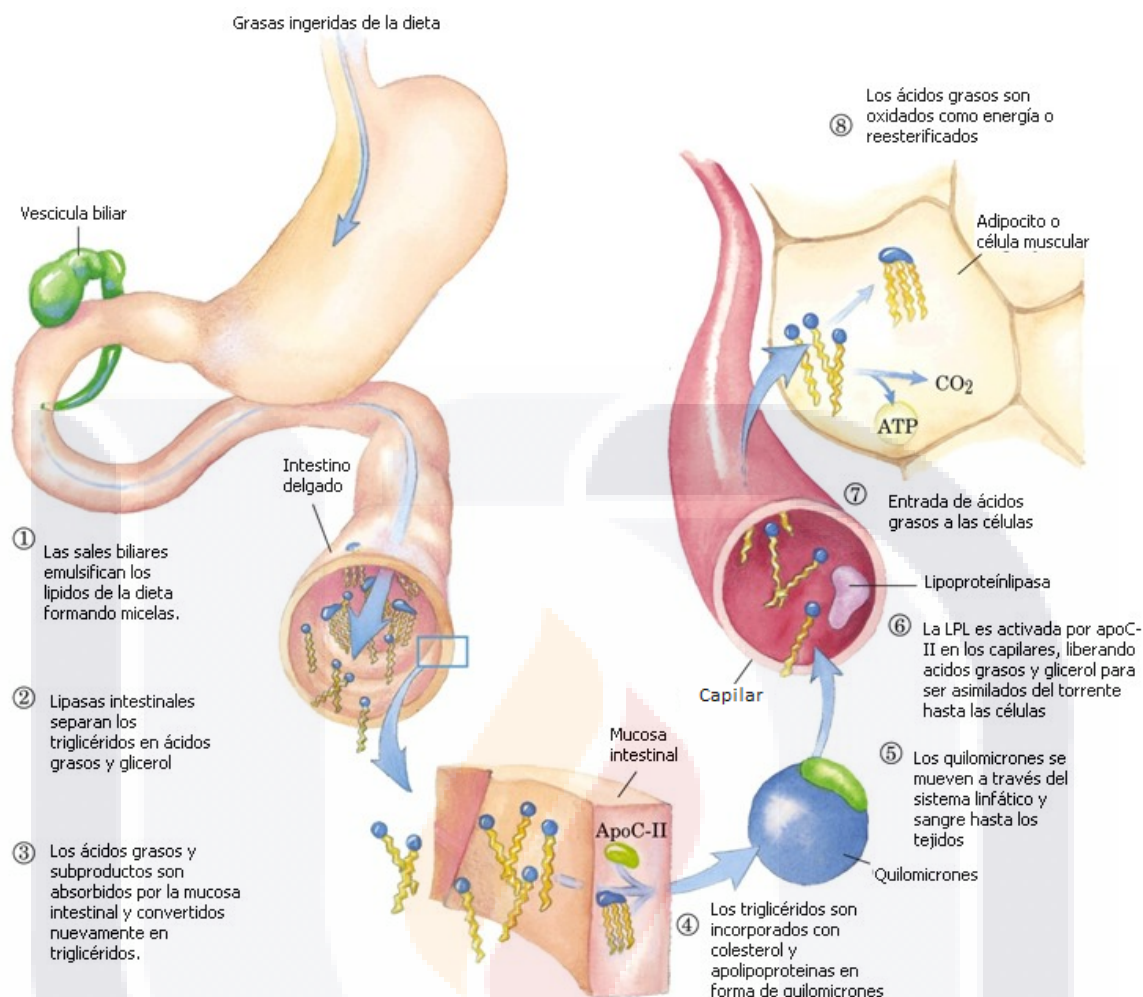


Figura 5. Proceso de absorción de los triglicéridos de la dieta (1-4) y empaquetamiento en forma de quilomicrones para su posterior asimilación a las células musculares o adiposas mediante la acción de la LPL (5-7). Modificado de (Nelson & Cox, 2017).

Parece ser que la hormona del crecimiento y las hormonas sexuales esteroideas como la testosterona y los estrógenos, inhiben la actividad de la LPL en el tejido adiposo y promueve la movilización de lípidos, pero incrementa la actividad en tejido muscular esquelético y cardíaco. Se sabe que los estrógenos reducen la ganancia de masa grasa seguida de una ovariectomía en roedores, posiblemente la actividad de la LPL esté involucrada en este proceso regulatorio. En síntesis la LPL contribuye al metabolismo de las lipoproteínas, utilización y almacenaje de lípidos en diferentes tejidos, tiene actividad metabólica en respuesta a cambios hormonales y de medio ambiente, contribuye al balance energético, acción de la insulina y regulación del peso corporal.

2. Hipótesis

La administración del acetato de leuprolida promueve cambios en la composición corporal sobre la cantidad de masa grasa, masa libre de grasa, tamaño y peso de ratas hembra Wistar íntegras y ovariectomizadas.

3. Objetivo general

Evaluar el efecto de la administración de acetato de leuprolida sobre la composición corporal en ratas Wistar (*Rattus norvegicus*).

3.1 Objetivos específicos

1. Determinar cambios físicos corporales aparentes mediante estudios antropométricos en los animales de estudio.
2. Determinar la composición corporal de los grupos de estudio; porcentaje de grasa y masa libre de grasa.
3. Evaluar los cambios en la ingesta de alimento y líquidos para determinar diferencias en gasto energético.
4. Evaluar la tasa metabólica por cociente de intercambio respiratorio (VO_2/VCO_2) para determinar variaciones en la actividad metabólica entre grupos controles y tratados con acetato de leuprolida.
5. Medir la expresión del RNA mensajero para ghrelina, leptina y lipoproteínlipasa, mediante RT-PCR.

4. Material y métodos

4.1 Modelo animal y grupos de evaluación

Se utilizaron 96 ratas hembra de la cepa Wistar de 30 días de edad y se formaron 4 grupos de animales en función al peso homogéneo. Los grupos formados se mantuvieron con acceso a agua y alimento para roedor *ad libitum* y se identificaron según el tratamiento que recibió cada grupo quedando de la siguiente manera:

Grupo 1 Control (CTRL): Este se conformó con animales íntegros a los cuales sólo se les aplicó un volumen equivalente de solución salina 0.9 % respecto a los grupos tratados con el análogo de GnRH.

Grupo 2 Ovariectomizado (OVX): Este grupo se formó con animales a los cuales se les practicó una ovariectomía bilateral total, y al igual que el grupo control, sólo recibieron un volumen equivalente de solución salina 0.9 %.

Grupo 3 Ovariectomizado + Acetato de Leuprolida (OVX+AL): se conformó por animales a los cuales se les realizó una ovariectomía bilateral total y además recibieron una dosis de 5 µg/kg.día de acetato de leuprolida.

Grupo 4 Acetato de leuprolida (AL): corresponde a un grupo formado con animales íntegros sin ninguna intervención quirúrgica, pero que además recibieron una dosis de 5 µg/kg.día de acetato de leuprolida.

4.1 Dosis de acetato de leuprolida

Para establecer la dosis de acetato de leuprolida se partió de diferentes observaciones en el laboratorio y reportes en los cuales han observado efecto biológico suficiente sin llegar a desensibilizar receptores a GnRH lo cual podría suponer una pérdida en la efectividad del análogo y por lo tanto del efecto deseado. Partiendo de lo anteriormente descrito, se utilizó una dosis de 5 µg/kg.día de acetato de leuprolida (Sigma Aldrich, No. Cat. L0399-5MG), el cual, es un análogo de GnRH sintético con mayor afinidad al receptor que la propia molécula de GnRH de producción endógena, permanece con mayor actividad biológica debido a su prolongada vida media. Posee modificaciones en la secuencia de aminoácidos que evita ser degradado por endopeptidasas internas lo cual aumenta su tiempo de acción, la vía de administración que se utilizó fue intramuscular.

4.2 Periodos de evaluación

Una vez seleccionados los grupos de estudio (n=24 c/u), los animales tanto del grupo identificado como OVX y OVX+AL se les realizó una ovariectomía bilateral total para retirar los ovarios bajo las normas institucionales de trato animal, esto con la finalidad de evitar el mecanismo de acción de la FSH y LH sobre la secreción gonadal y así poder medir únicamente el efecto de la GnRH. Posterior a la intervención quirúrgica los animales se recuperaron durante un periodo de 15 días para iniciar con el tratamiento de acetato de leuprolida donde se estableció un esquema de aplicación diaria del análogo por 120 días y durante este periodo se realizaron sacrificios cada 20 días para la obtención de diferentes muestras (Fig. 6).

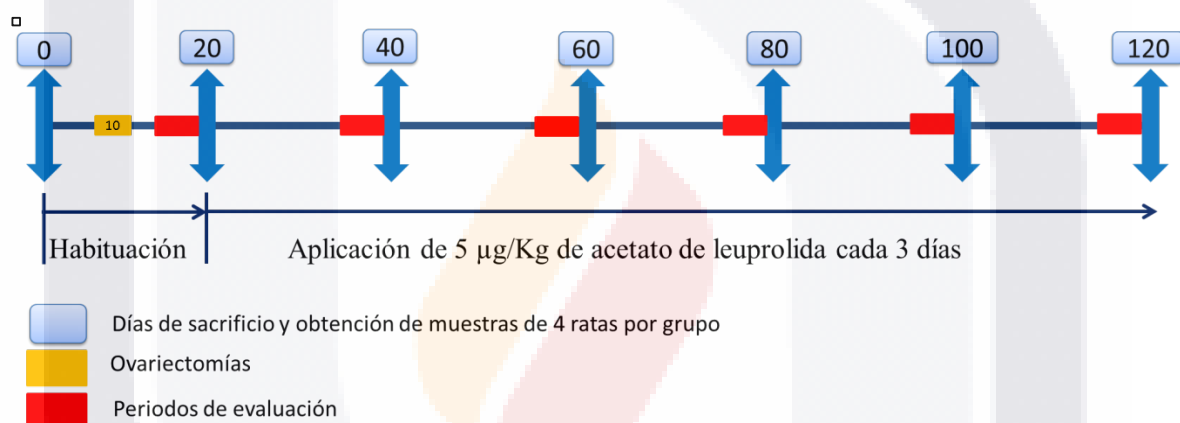


Figura 6. Cronograma experimental, la duración del experimento constó de un total de 120 días bajo una administración continua de acetato de leuprolida y tiempos de sacrificio cada 20 días para obtención de muestras para su posterior análisis.

4.3 Determinación de indicadores murinométricos

Las variables a considerar para este ensayo se realizaron de forma continua para evaluar los cambios morfológicos del animal y poder calcular indicadores murinométricos. Las variables que se consideraron para este propósito fueron las siguientes: peso (g), longitud naso-anal (cm), índice ponderal ($\text{g}/^3\sqrt{\text{cm}}$) y el índice de Lee ($^3\sqrt{\text{g}/\text{cm}}$). Para la determinación de peso corporal se utilizó una balanza granataria de canastilla de 0.1 g de precisión (Ohaus); el pesaje se realizó con los animales consciente. Para la determinación de la longitud naso anal se utilizó una cinta métrica con 0.1 mm de precisión colocada sobre una mesa con el animal bajo estado de anestesia en posición de decúbito ventral sobre la cinta métrica. Para relacionar las variables de peso (g) y longitud total (cm) se seleccionaron

el índice ponderal y el índice de Lee, como buenos indicadores predictivos de composición corporal como la masa grasa y la masa libre de grasa.

4.4 Análisis de Hidrodensitometría

Para el efecto de determinar hidrodensitometría, se diseñó un sistema que permite realizar estas determinaciones con el animal *in vivo*, lo cual permite realizar intervenciones de tipo longitudinal y así dar seguimiento a los cambios corporales no invasivos. En el siguiente esquema se muestra el diseño propuesto por Hohl *et al* (Fig. 7).

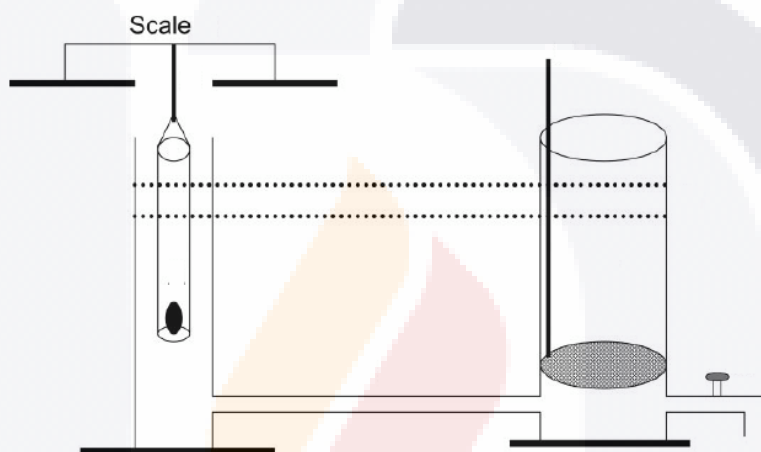


Figura 7. Esquema original del equipo propuesto para determinar hidrodensitometría en ratas Wistar, el cual consiste en dos tubos interconectados desde su base que permite ingresar al animal y tener lecturas precisas con mínimas variaciones. Modificado de (Hohl *et al.*, 2007).

El sistema consiste en dos tubos conectados por la base mediante una manguera flexible que permite reducir las variaciones en el nivel de agua causado por el animal, una vez que este es colocado dentro del tubo correspondiente. En la figura 8 se muestra el sistema elaborado en el laboratorio. El diseño del aparato de hidrodensitometría permite tomar las lecturas de forma precisa minimizando las variaciones del desplazamiento del nivel de agua por movimiento del animal. Este mecanismo es utilizado ampliamente para la validación de estudios de composición corporal que son realizados por otro tipo de técnicas (rayos x, absorciometría fotónica dual y bioimpedancia eléctrica) debido a alta reproducibilidad y precisión.

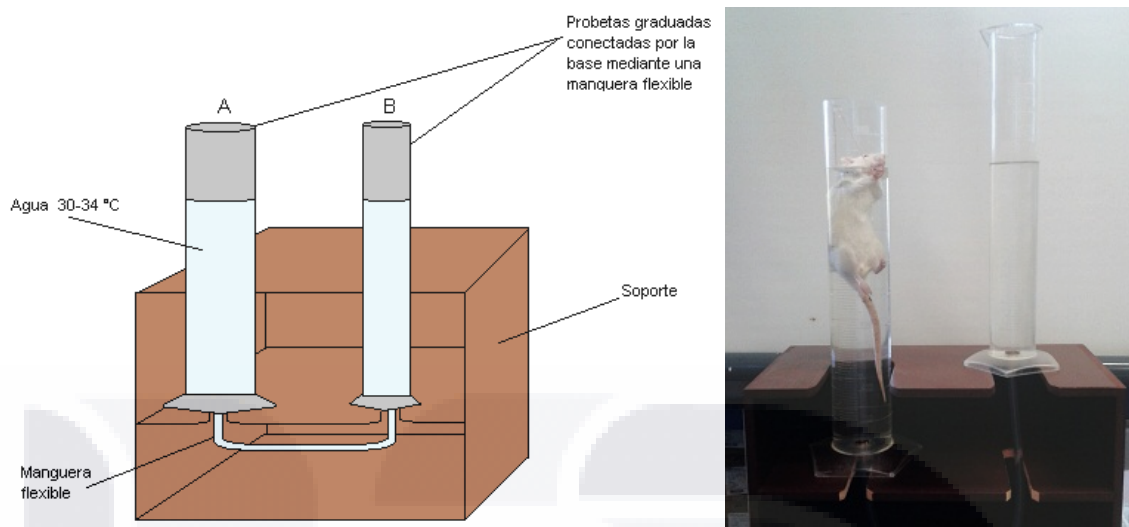


Figura 7. Equipo de hidrodensitometría elaborado en el laboratorio para la determinación de la densidad del animal y su posterior cálculo de composición corporal. Cada animal era colocado dentro del tubo de mayor diámetro y se registraba los cambios del volumen desplazado de agua.

Previo a cada periodo de sacrificio se realizaron pruebas de hidrodensitometría para todos los animales de cada grupo. Los tubos son llenados con agua a una temperatura de 30-34 °C y llevados a un volumen constante para tubo A y B, posteriormente los valores del volumen de A y B son anotados y a estos valores se le conoce como volumen inicial. El ensayo consistió en colocar al animal bajo el efecto de anestesia en el tubo A y se determinó el desplazamiento de agua del mismo tubo y de igual forma del tubo B a este valor de volumen desplazado se le conoce como volumen final. Para conocer la densidad del animal solo se necesita dividir el valor del peso de cada animal entre el volumen de agua desplazado del mismo y se obtiene un valor con unidades en g/mL.

4.4.1 Evaluación de composición corporal

Para determinar la composición corporal, se eligió el modelo de dos y tres componentes los cuales clasifican la composición corporal en masa grasa (MG) y masa libre de grasa (MLG) para el modelo uno y para el modelo dos MG, MLG y masa residual (MR) para el segundo modelo. La diferencia entre estos dos métodos radica en que el modelo uno calcula la composición en porcentaje, mientras que el modelo dos lo hace en unidades de masa (g).

Para calcular estos componentes se emplean ecuaciones predictivas las cuales consideran diferentes variables. Ambas ecuaciones se muestran a continuación:

Tabla 4. Ecuaciones predictivas para determinar los componentes de masa grasa y masa libre de grasa.

Ecuación 1	Ecuación 2
$\%MG = (a/D + b) BWc$	$MG = (-a) + (b \cdot IP)$
Dónde: MG= Masa Grasa expresada en porcentaje Constantes: a y b con valores de 0.042 y -0.038 respectivamente D= Densidad en mg/mL del animal BW= Peso total del animal en gramos	Dónde: MG= Masa grasa expresada en gramos Constantes a y b con valores de -45.2 y 1.09 IP= Índice ponderal de la rata $IP = P^3 \sqrt{LT}$
Cossio-Bolaños et al., 2011	Dónde: P= Peso en gramos LT= Longitud naso-anal en centímetros Lukaski H. et al., 1993

Para obtener los valores de porcentaje de masa grasa para la ecuación 1 se utilizaron los resultados de hidrodensitometría de cada animal. Para calcular la masa libre de grasa por la ecuación 1 basta con restar el porcentaje de grasa de 100 que representa el peso total del animal. Para la ecuación 2 se requirieron variables murinométricas como peso total, longitud del animal y el índice ponderal.

4.5 Consumo de alimento y agua

Se realizó un registro de consumo de alimento y agua cada 24 horas durante la realización del experimento, en donde a cada jaula se les proporcionó una cantidad igual tanto de alimento medido en gramos y de agua medido en mL. Los días subsecuentes se registró el peso y el volumen consumido de alimento y agua respectivamente por la mañana a la misma hora. Los valores obtenidos se promediaron por periodos de evaluación los cuales corresponden a los días de sacrificio. Cada una de las determinaciones se normalizó en función a 100 gramos de peso del animal para poder hacer comparaciones más precisas.

4.5.1 Composición de la dieta

La dieta utilizada en el experimento consistió en alimento balanceado para roedores (Nutricubos ® Purina) elaborado a partir de cereales, pastas de oleaginosas, harina de pescado y alfalfa. La tabla 5 proporciona el análisis proximal del alimento antes mencionado.

Tabla 5. Análisis químico proximal de la dieta utilizada en el experimento.

Humedad	12 % máx.	Proteína	23 % mín.
Grasa	3.0 % mín.	Fibra	6.0 % máx.
Cenizas	7.0 % máx.	E.L.N.	49.0 % P.Dif.
Calcio	1.0 % mín.	Fósforo	0.6 % mín.

Los animales tuvieron acceso libre al alimento y agua, únicamente permanecieron en ayuno por 4-6 horas para realizar los estudios de composición corporal y cuando eran seleccionados para los sacrificios correspondientes para la obtención de muestras y análisis de indicadores bioquímicos.

4.6 Procedimiento de obtención de muestras biológicas y disección

En cada periodo de sacrificio se obtuvieron muestras para su posterior análisis, a cada animal bajo efecto de anestesia se realizó una disección ventral y por cada animal se colectó sangre periférica de la arteria aorta la cual se centrifugó a 3500 r.p.m. para separar el suero y realizar determinaciones de concentración de glucosa, colesterol y triglicéridos. Se colectaron muestras de fondo gástrico, tejido musculo esquelético y tejido pericárdico para el aislamiento del RNA total y determinar expresión del RNAm de grelina, lipoproteínlipasa y leptina respectivamente. Posteriormente el animal se evisceró completamente desde la faringe hasta la última porción del colon y se determinó el peso en gramos al cual se le consideró como masa residual. Una vez que el animal es eviscerado se disecó la piel desde los muñones de las patas traseras hasta las patas delanteras y a la altura del cuello, a este componente se le consideró como la masa grasa del animal, así mismo, se determinó el peso de este componente. Por último a la carcasa remanente se le determinó el peso el cual corresponde a la masa libre de grasa. Con la obtención de estos componentes se determinaron los cambios de los mismos cada periodo de sacrificio durante los 120 día que duró el experimento.

4.6.1 Análisis químico de grasa

Se realizaron ensayos de determinación de grasa por el método de Bligh y Dyer en la piel obtenida a cada muestra, esto con la finalidad de hacer estudios de correlación entre los resultados de este análisis y las determinaciones de grasa utilizando ecuaciones predictivas. El método consiste en realizar un homogeneizado del tejido con volúmenes 1:1

de metanol:cloroformo en función del peso de la muestra (100mL/100g). Por cada 100 g de muestra fresca o congelada se homogeneizó por dos minutos con una mezcla de 100 mL de metanol y 100 mL de metanol. Posteriormente se agregó a la mezcla 100 mL de agua destilada se homogeneizó por otros 2 minutos. El homogeneizado se filtró a través de un filtro Whatman No. 1 empleando un embudo de Büchner con una ligera succión empleando matraz kitasato. El filtrado se transfirió a una probeta graduada y se esperó unos minutos a que clarificara y separara. El volumen de cloroformo se registró (150 mL) y la fase alcohólica se retira por aspiración, un pequeño volumen se retira para asegurarse de que se retiró por completo la fase superior. El cloroformo resultante contiene la parte lipídica purificada. De la grasa total se tomó una alícuota del extracto lipídico y se secó a temperatura de 40 o 50° C en un recipiente previamente tarado y se determina el peso total de la grasa y se resta del peso inicial (Fig. 9).

El contenido lipídico se calculó utilizando la ecuación: Lípidos totales= (PLA)*(VCC)/VA

Dónde:

PLA= peso de los lípidos de la alícuota

VCC= volumen de la capa de cloroformo

VA= Volumen de la alícuota

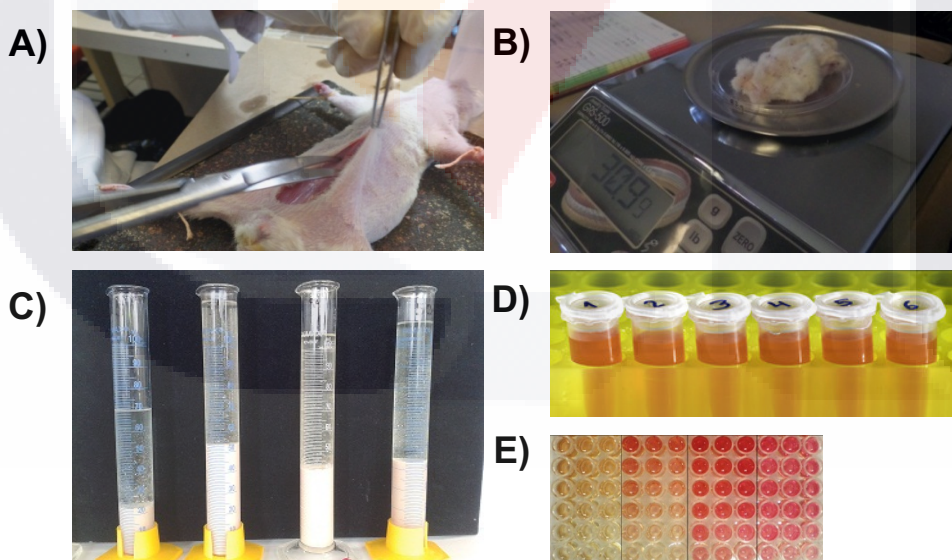


Figura 9. Procedimiento general de disección y extracción química de lípidos totales. A) Disección de piel y carcasa, B) Pesaje de los componentes, C) Extracción química de lípidos a partir de la piel, D) Obtención de alícuotas para cuantificación y E) Verificación de lípidos por el método de sulfo-fosfo vainillina.

4.7 Ensayos de química en sueros

A partir de los sueros obtenidos por centrifugación de la sangre colectada en los periodos de sacrificio, se realizó la valoración de glucosa, colesterol y triglicéridos por un método enzimático de tipo colorimétrico utilizando kits de diagnóstico DiaSys glucosa (No. Cat. 1 2500 99 10 026), colesterol (No. Cat.1 1300 99 10 026) y triglicéridos (No. Cat. 1 5710 99 10 021). El procedimiento para los tres ensayos se realizó bajo las mismas condiciones determinando la absorbancia (500 nm 1 cm paso óptico) del reactivo de cada prueba con el suero de la muestra en turno con incubación de 20 minutos a temperatura ambiente y comparando con un blanco y estándares de concentración conocida.

Para el cálculo de la concentración de glucosa, colesterol y triglicéridos se aplicó la siguiente ecuación:

$$[\text{mg/dL}] = (\text{Abs Muestra} / \text{Abs estándar}) * (\text{estándar mg/dL})$$

Las concentraciones de los estándares fueron de 10, 200 y 200 mg/dL para glucosa colesterol y triglicéridos respectivamente.

Los ensayos se realizaron cada periodo de sacrificio para registrar las variaciones en función al tiempo y tratamiento.

4.8 Determinación de consumo oxígeno y producción de bióxido de carbono

Previo a la etapa de obtención de muestras se realizará por cada animal que conforme a cada grupo el volumen de oxígeno consumido (VO_2) y de dióxido de carbono (VCO_2) producido para determinar el gasto calórico mediante el uso de una cámara de circuito abierto con medidores de CO_2 y O_2 . El modelo de la cámara metabólica a utilizar es el propuesto por Stock, 1975 con adaptaciones realizadas en el laboratorio (Fig. 10).

4.8.1 Analizadores de gases

Para determinar las concentraciones de gases en la cámara metabólica se utilizó un medidor de oxígeno (Oxygen Meter Modelo: DO-5510HA) el cual utiliza una sonda polarografica con sensor de temperatura incorporado. La determinación de bióxido de carbono se realizó con un analizador (Thermo-Hygro-NDIR CO_2 meter Modelo: TES-1370) que incluye sensor de temperatura y humedad relativa el cual se basa en el sistema de detección infrarroja no dispersiva (NDIR). Ambos analizadores, previo a su uso, eran calibrados de acuerdo a las indicaciones del fabricante y se acoplaron al sistema de circuito

abierto en donde se colocaba a la rata por un periodo de tiempo y se tomaban las lecturas de ambos gases.

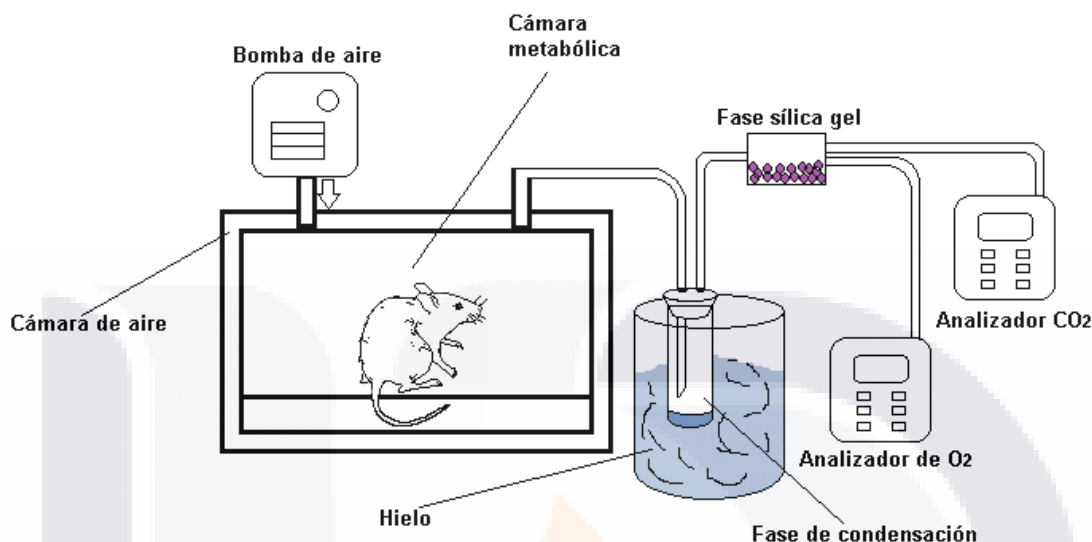


Figura 1. Cámara metabólica para determinación de VO_2 y VCO_2 . El sistema comprende un circuito abierto en donde se registran la concentraciones de entrada de O_2 y CO_2 a la cámara y durante aproximadamente 8 minutos se registra la concentración de salida de O_2 y CO_2 .

4.8.2 Descripción del circuito abierto

El sistema comprende una cámara elaborada de plexiglás con doble pared para tener una interfase de aire el cual no permite la variación de temperatura respecto al ambiente exterior de la misma, cuenta con una tapa elaborada del mismo material y con un empaque que permite el cierre hermético para evitar entrada o fugas de aire. Conectado a la tapa se cuenta con un dispensador con flujo de aire continuo y una salida donde la mezcla de aire producida por la respiración del animal es pasado a través de una fase de condensación y enfriamiento con la finalidad de retener el agua y mejorar la exactitud de las determinaciones (Fig. 10,11). Previo a la salida final del aire enfriado y condensado, se hace pasar por una fase de sílica-gel para retener la humedad remanente, sin embargo, ensayos previos han demostrado que la fase de enfriamiento y condensación es suficiente para tener lecturas más consistentes. Los sistemas de circuito abierto, están diseñados con la finalidad de tener un flujo constante de aire respirable para el animal sin cambios en presión interna de la cámara y posibles alteraciones en las determinaciones provocadas por respuestas fisiológicas adaptativas de los animales. Además que la mezcla de aire que ingresa a la cámara está en las mismas condiciones ambientales que las del animal al momento de ingresarlo.

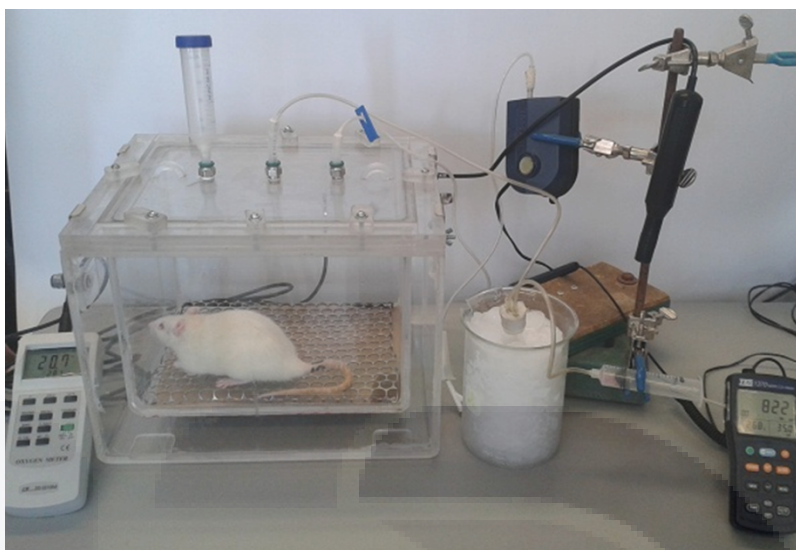


Figura 11. Ensayo de determinación de O_2 y CO_2 en cámara metabólica de flujo abierto con analizadores. Cada animal permanecía por un periodo aproximado de 8 minutos con la finalidad de mantener constante el flujo de ambos gases.

Previo a la determinación de gases los animales se habituaron por tres días antes de la primer determinación, esto con la finalidad de reducir episodios de estrés, hiperventilación y de desplazamiento dentro de la cámara, lo cual puede alterar las determinaciones. El animal es colocado dentro de la cámara cerca de 8 minutos y posteriormente al cerrado de la misma se hace pasar un flujo de aire del cual se conoce la tasa de inyección y se determina la concentración del flujo de entrada de O_2 y CO_2 . Transcurrido este tiempo se procede a la determinación de la concentración de gases en el flujo de salida de la cámara metabólica. Las unidades en la cuales los sistemas de detección entregan las lecturas son en valores porcentuales para el medidor de oxígeno y en ppm para el analizador de bióxido de carbono. Los pasos claves para realizar estas determinaciones son los siguientes:

- a. Se calcula el cambio de concentraciones de CO_2 o de O_2 entre la entrada de aire y la salida (afectadas por el animal) de la cámara metabólica:

$$\Delta CO_2 = \text{salida de } CO_2 - CO_2 \text{ entrada}$$

$$\Delta O_2 = \text{entrada de } O_2 - \text{salida } O_2$$

- b. Las unidades de CO_2 se miden en ppm, y de O_2 se miden en %, por lo que estos valores se deben convertir a μL por mL de gas. (1 ppm = 0,001 $\mu L/mL$; 1 % = 10 $\mu L/mL$)

c . La frecuencia respiratoria (RO_2 o RCO_2 , como $\mu\text{L}/\text{min}$) se calcula multiplicando la ΔCO_2 o ΔO_2 por los valores de la tasa de flujo de aire (en mL/min) utilizados en el experimento:

$$RO_2 = \Delta O_2 \text{ (l / ml) } \times \text{velocidad de flujo (mL/min)}$$

$$RCO_2 = \Delta CO_2 \text{ (l / ml) } \times \text{velocidad de flujo (mL/min)}$$

d. Para hacer posible la comparación de tasas entre animales de distinta masa, ajustar el resultado a una unidad (gramos) de masa animal dividiendo la masa del animal en gramos.

Los resultados para ambos gases se expresaron en $\text{mL}/\text{min} \cdot 100 \text{ g}$ de peso animal.

4.9 Expresión del RNAm de grelina, leptina y lipoproteínlipasa

A partir de muestras obtenidas en cada sacrificio de musculo esquelético, tejido pericárdico y fondo gástrico se realizó una extracción de RNA total (RNAt) mediante la homogeneización de los tejidos con TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA). Posteriormente se realizó una reacción de retrotranscripción utilizando el kit High Capacity cDNA synthesis (Applied Biosystems: Cat. 4,368,813) a partir de $3 \mu\text{g}$ de RNAt en conjunto con $0.8 \mu\text{L}$ de $25\times$ dNTPs (100 mM), $2 \mu\text{L}$ $10\times$ random primers, $2 \mu\text{L}$ $10\times$ RT buffer y 1 U de Multiscribe RT en un volumen final de reacción de $20 \mu\text{L}$ el cual se completó utilizando agua libre de nucleasas. La reacción se realizó en un termociclador (Techne Genius: FGEN02TP) con las siguientes condiciones de incubación: $25^\circ\text{C}/10 \text{ min}$, $37^\circ\text{C}/120 \text{ min}$ y $85^\circ\text{C}/5 \text{ min}$. Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cada ensayo se realizó con 0.25 de cDNA, $10\times$ PCR Buffer Minus Mg, 10 mM dNTPs mix, 50 mM MgCl_2 , 10 mM para cada pareja de oligonucleotidos a analizar (Grelina, leptina, lipoproteínlipasa y GAPDH), (Tabla 6), $0.25 \mu\text{L}$ de Taq polimerasa en un volumen final de $25 \mu\text{L}$.

Tabla 6. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en el ensayo de PCR y sus tamaños esperado de productos de amplificación.

Nombre	Secuencia sentido 5-3'	Secuencia antisentido 5-3'	Tamaño
GHR	TTGAGCCCAGAGCACCAGAAA	AGCTTCTGCCTCCTCTGCAACT	347 pb
LEP	ATGTGCTGGAGACCCCTGTGCCG	GCGAGACCTCCTCCATCTGCTGG	334 pb
LPL	CCCCAGCAAGGCATACAGGT	CGGCAGGGTGAAGGGAATGT	292 pb
GAPDH	AGACAGCCGCATCTTCTTGT	CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT	207 pb

Las condiciones óptimas para los ensayos de PCR fueron 35 ciclos de 94 °C/30 s, 56 °C/30 s, y 72 °C/ 30 s de desnaturalización, alineación y extensión respectivamente. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa (2%) horizontal para los productos de amplificación de los diferentes ensayos de PCR utilizando un marcador de 0-1.2 kilobases para identificar el tamaño esperado de los amplicones. Finalizada la electroforesis, se impregnó el gel con bromuro de etidio al 0.05 % y se visualizó bajo luz UV. La intensidad de las bandas se analizaron utilizando el software QuantityOne®, estas intensidades se normalizaron en función a la señal del RNAm constitutivo GAPDH (análisis proporcional de Grelina/GAPDH, Leptina/GAPDH y LPL/GAPDH). Los resultados se analizaron mediante una ANOVA de una vía con un post test de Tukey.

4.10 Análisis estadístico

Debido a la naturaleza del estudio en la mayor parte del análisis estadístico se consideró la interacción entre el tiempo y el tratamiento por lo cual, la prueba estadística más adecuada fue realizar análisis de ANOVA de dos vías con un post-test Bonferroni, para saber si los efectos observados se produjeron por la aplicación del acetato de leuprolida o bien, si ocurren en función al tiempo. Los datos presentados en las figuras están representadas como la media y el error estándar de la media. Las diferencias estadísticas se asumieron cuando $p < 0.05$.

5. Resultados

5.1 Evaluaciones murinométricas

5.1.1 Peso corporal

El peso corporal es una variable determinante en estudios de composición corporal, ya que en función al mismo pueden calcularse diferentes indicadores que pueden demostrar la variabilidad de composición corporal y la respuesta a los diferentes tratamientos.

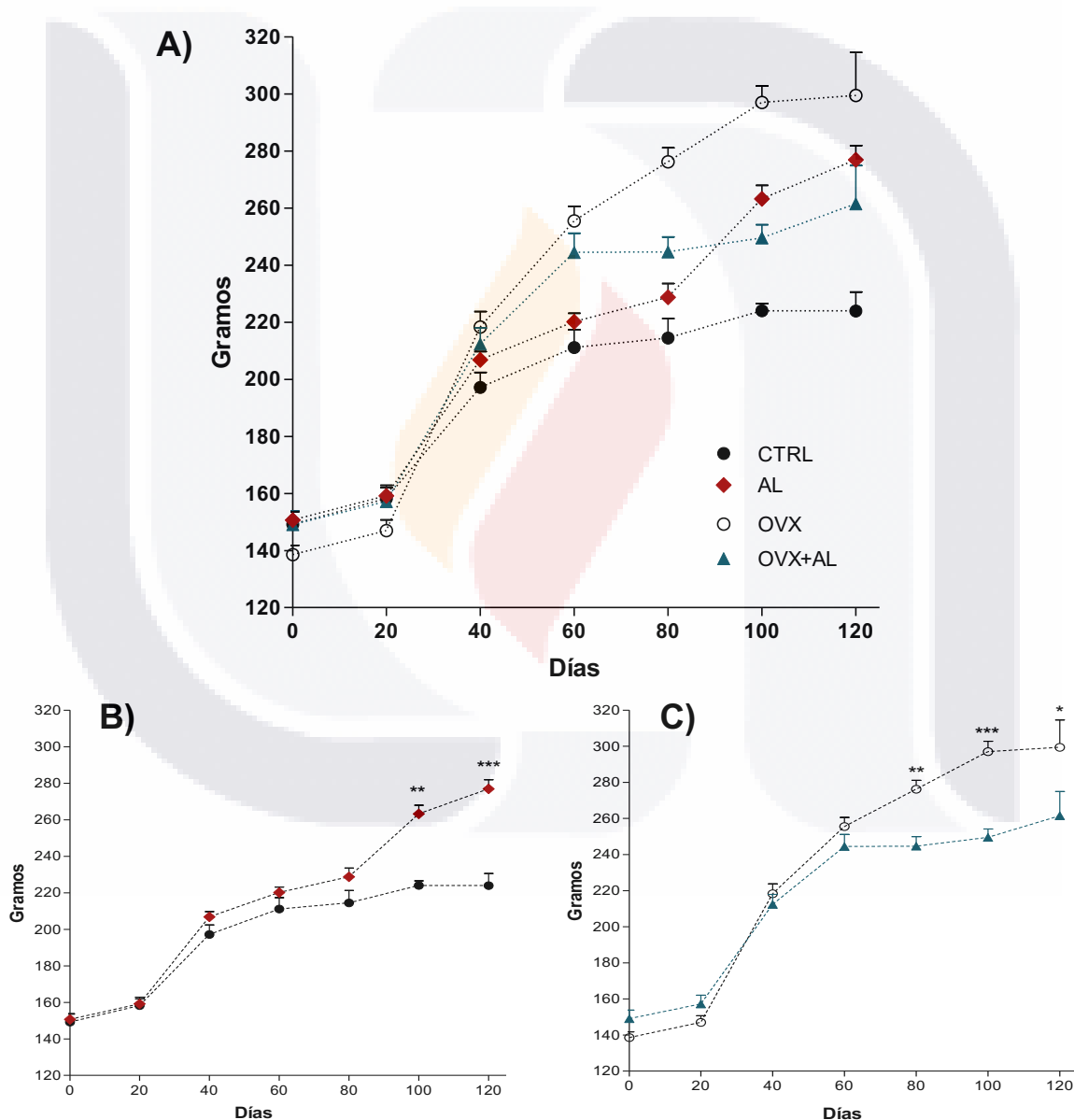


Figura 12. A) Peso corporal obtenido desde el inicio del experimento hasta los 120 día para todos los grupos de estudio, B) comparación entre los grupos CTRL y AL y C) OVX vs OVX+AL. ANOVA 2V-BONFERRONI, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$.

En la figura 12 se muestra el peso corporal de todos los grupos en los diferentes periodos de evaluación y se observa una ganancia durante el transcurso del experimento, sin embargo, el grupo OVX presenta mayores valores de ganancia de peso y se observan diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control para los periodos de evaluación que corresponden a los días 40 ($p < 0.01$), 60, 80 y 100 ($p < 0.001$). El grupo OVX+AL en comparación al grupo CTRL presentó diferencias desde el día 60 hasta el día 100 y únicamente con diferencias estadísticamente significativas en los periodos de 60 y 80 días $p < 0.001$ y $p < 0.01$ respectivamente. El grupo AL presentó valores mayores de ganancia de peso respecto al grupo control pero únicamente en el día 100 tuvo diferencia estadísticamente significativa $p < 0.01$ (Fig. 12-B).

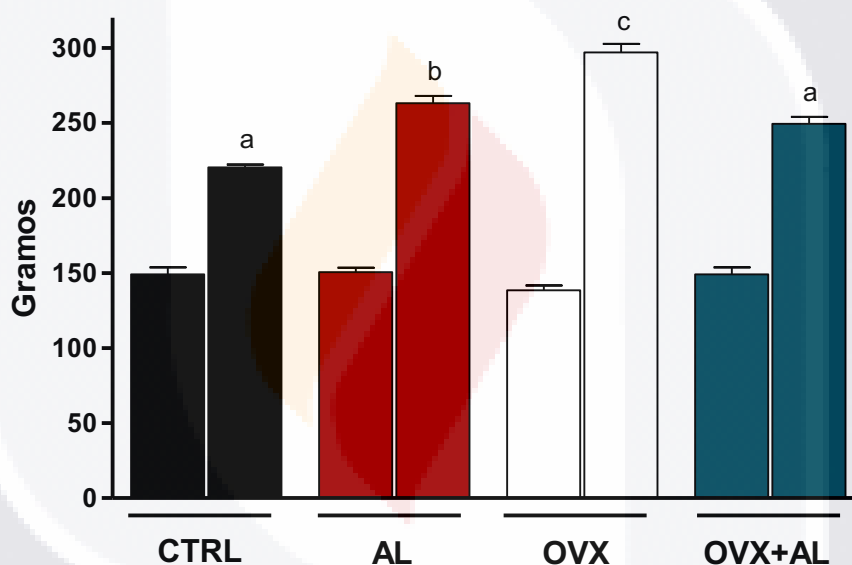


Figura 13. Diferencia entre el peso al inicio y al final del experimento para cada grupo (día 20 vs día 120). t Student a) $*p < 0.05$, b) $**p < 0.01$ y c) $***p < 0.005$.

Al finalizar el experimento todos los grupos presentaron una ganancia de peso considerable y es importante resaltar que los grupos OVX, OVX+AL y AL presentaron al final mayor incremento en función de su peso inicial y además, en cantidades importantes respecto al grupo control. Si se compara esta ganancia de peso en valores porcentuales resulta que existe una diferencia de 32.2%, 53.37%, 40.1% y 42,9 % para los grupos CTRL, OVX, OVX+AL y AL respectivamente, esto en función de su peso inicial y final (Fig. 13, Tabla 7).

Tabla 7. Porcentaje de incremento de peso en función al promedio del peso inicial y el peso final.

Grupo	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Porcentaje de incremento
CTRL	149.1 ± 4.6	220.3 ± 2.5	32.2 %
OVX	138.5 ± 3.2	296.9 ± 3.2	53.37 %
OVX+AL	149.1 ± 4.7	249.4 ± 4.7	40.1 %
AL	150.6 ± 2.9	263.2 ± 2.9	42.96 %

5.1.2 Longitud naso-anal

La longitud naso-anal es un indicador de crecimiento en cuanto a la longitud del animal y las determinaciones se realizan durante el transcurso del tiempo. En la figura 14 se muestra las diferencias de longitud entre los diferentes grupos experimentales y principalmente en los tres últimos periodos de evaluación es cuando esta diferencia es más notable. Respecto al grupo CTRL el grupo OVX fue el que presentó mayor diferencia con una significancia estadística con un valor $p > 0.001$, 0.01 y 0.05 para los días 40, 60 y 80 respectivamente. En tanto que el grupo OVX+AL sólo presentó diferencias en el día 80 respecto al grupo CTRL ($p > 0.05$). Finalmente el grupo AL presentó en los días 80 y 100 diferencias estadísticamente significativas con una $p < 0.01$ y $p < 0.05$ respectivamente.

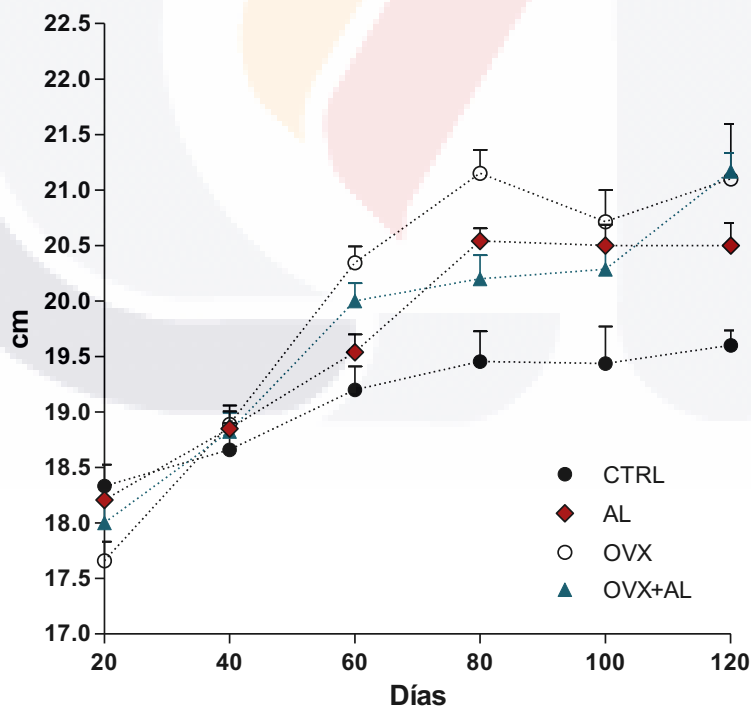


Figura 14. Longitud naso-anal obtenida en centímetros del día 20 hasta el día 120 en todos los grupos experimentales. El grupo CTRL sirve como referencia de incremento de longitud normal y las diferencias que este presenta respecto al resto. (ANOVA 2V-BONFERRONI, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y $p < 0.001$).

Para poder apreciar el efecto del tratamiento en los grupos experimentales, se realizaron las comparaciones entre animales con similares condiciones experimentales y se encontró que a partir del día 80 al 120 el grupo AL resultó con mayor longitud naso-anal en comparación con el grupo CTRL ($p<0.001$). En tanto que el grupo OVX y OVX+AL no tuvieron diferencias entre sí, pero con valores muy similares al grupo AL (Fig. 15 A, B). La longitud naso-anal se incrementó en animales íntegros tratados (AL) como en aquellos con ovariectomía con y sin tratamiento (OVX y OVX+AL).

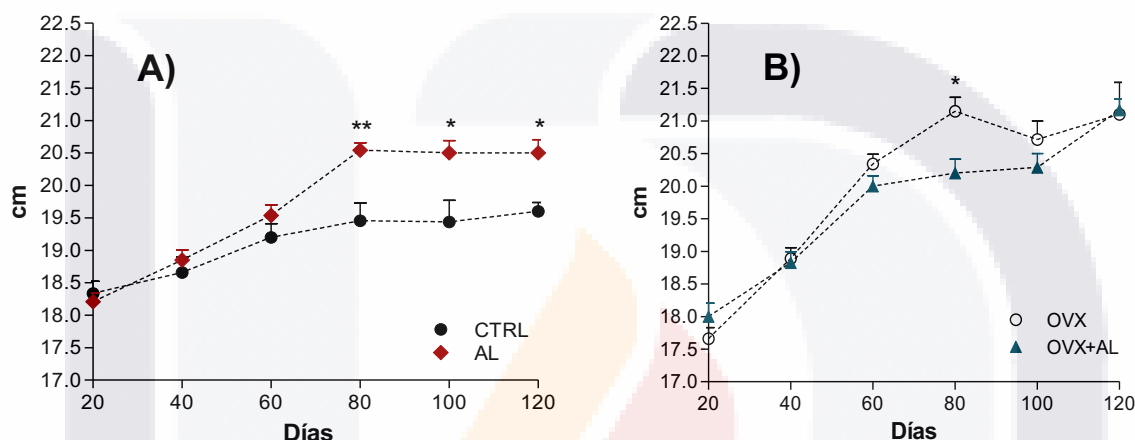


Figura 15. Longitud naso-anal obtenida en centímetros del día 20 hasta el día 120. A) Comparativa de entre los grupos CTRL y AL. B) Comparativa entre los grupos OVX y OVX+AL. ANOVA 2V-BONFERRONI, ** $p<0.01$ y * $p<0.05$.

5.1.3 Longitud nariz-cola

Debido a que la medición de longitud del animal cuando se realiza la determinación desde la nariz al ano puede tener mínimos márgenes de variación y por ende no observar los cambios en el crecimiento bajo diferentes condiciones, es necesario determinar la misma medición pero considerando la longitud que existe entre la nariz y la parte final de la cola (Fig. 16). Los resultados muestran que como se esperaba hubiera un incremento gradual en la longitud de los animales, sin embargo, a diferencia del ensayo de longitud naso-anal, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos equivalentes aunque si una clara diferencia de los grupos problema en comparación con el grupo CTRL (Fig.17). Al final del experimento el incremento porcentual de longitud nariz-cola para cada grupo fue de 10.9 %, 12.5 %, 13.6 % y 14.7 % para los grupos CTRL, AL, OVX y OVX+AL respectivamente (Fig. 18 A, B). Contrario a lo esperado, la determinación de longitud naso-anal resultó ser un mejor indicador de los procedimientos experimentales de este estudio.

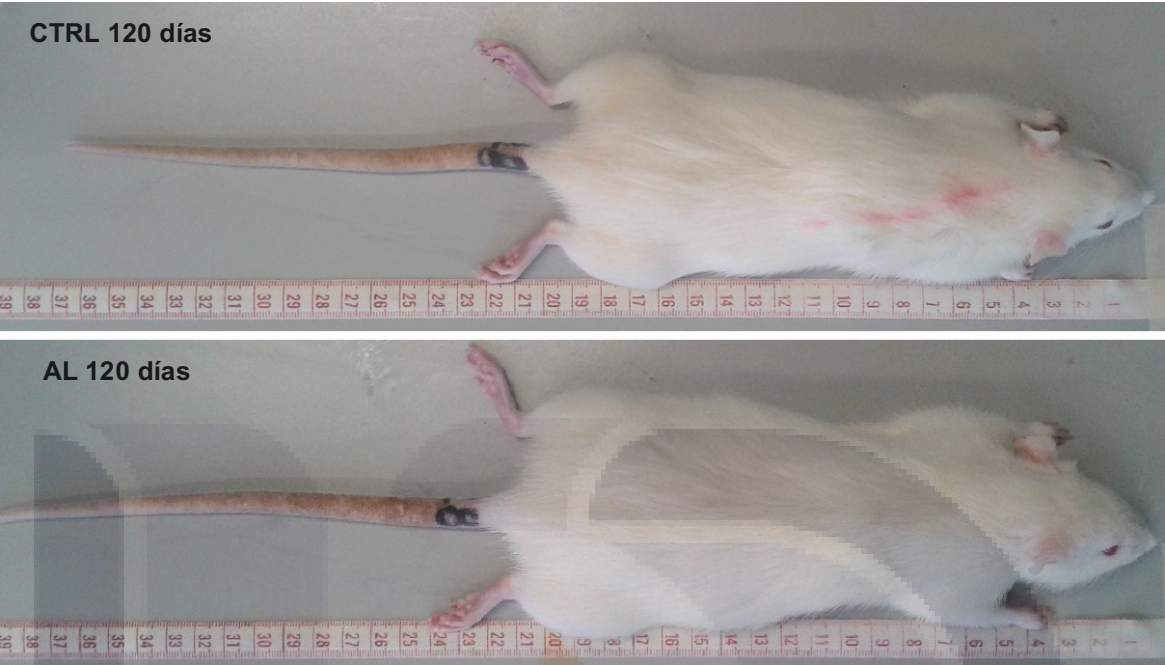


Figura 16. Imagen representativa de la determinación de longitud nariz-cola en dos ratas de los grupos experimentales CTRL y AL a los 120 días. El grupo AL en gran parte del experimento resultó con mayor longitud y volumen corporal comparado con el grupo CTRL.

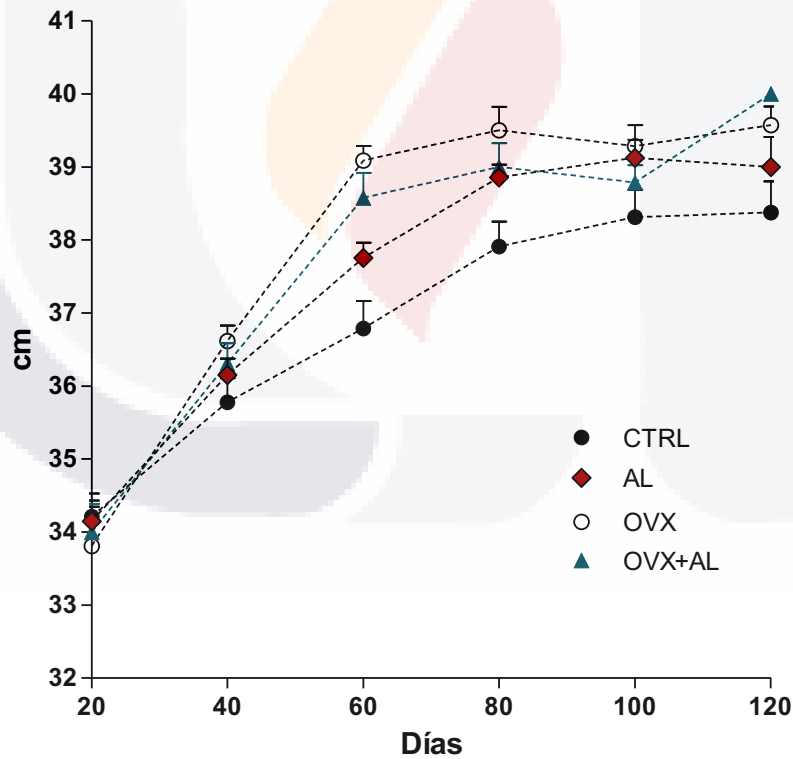


Figura 17. Longitud nariz-cola en cm del día 20 hasta el día 120. Los datos están representados como la media y el error estándar de la media. (ANOVA 2V-BONFERRONI, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ y $p<0.001$).

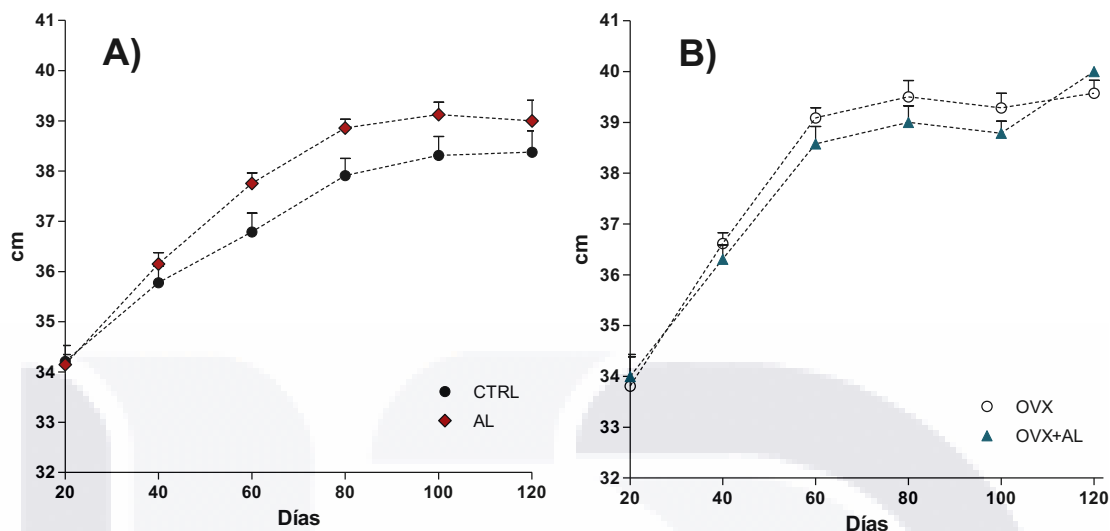


Figura 18. Longitud nariz-cola de los grupos equivalentes en su condición experimental. A) Gráfica comparativa entre los grupos CTRL y AL C) Gráfica comparativa entre los grupos OVX y OVX+AL. Cada punto representa la media y el error estándar de la media. (ANOVA 2V-BONFERRONI, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y $p < 0.001$).

Esta determinación de longitud es de valor debido a que el hecho de que no sean diferentes los valores durante los periodos de evaluación o varíen muy poco significa que la tasa de crecimiento en tamaño no se ve afectada considerablemente, más sin embargo, la composición corporal de los animales si cambia debido a que en un mismo promedio de tamaño longitudinal pueden existir diferentes contexturas en los animales y por ende diferente composición corporal.

5.1.4 Índice Ponderal

El índice ponderal (IP) es un indicador de masa corporal que mide la proporción de masa corporal en función a la longitud del animal. En términos generales, un bajo índice ponderal está asociado a una reducida masa magra, además, este resultado fue de utilidad para calcular la composición corporal mediante el uso de hidrodensitometría. Este indicador predice el volumen del animal en función de sus dimensiones murinométricas. Al finalizar el experimento el grupo CTRL tuvo un incremento de su IP 33.8 % final mientras que el grupo AL resulto mayor con sólo 2 % por encima del grupo CTRL. El grupo OVX finalizó con un incremento de IP de 48 % más que al inicio del experimento y cabe resaltar que el grupo OVX+AL finalizó con un 34.2 % de aumento de IP, manejando prácticamente valores muy similares a los del grupo CTRL (Fig. 19).

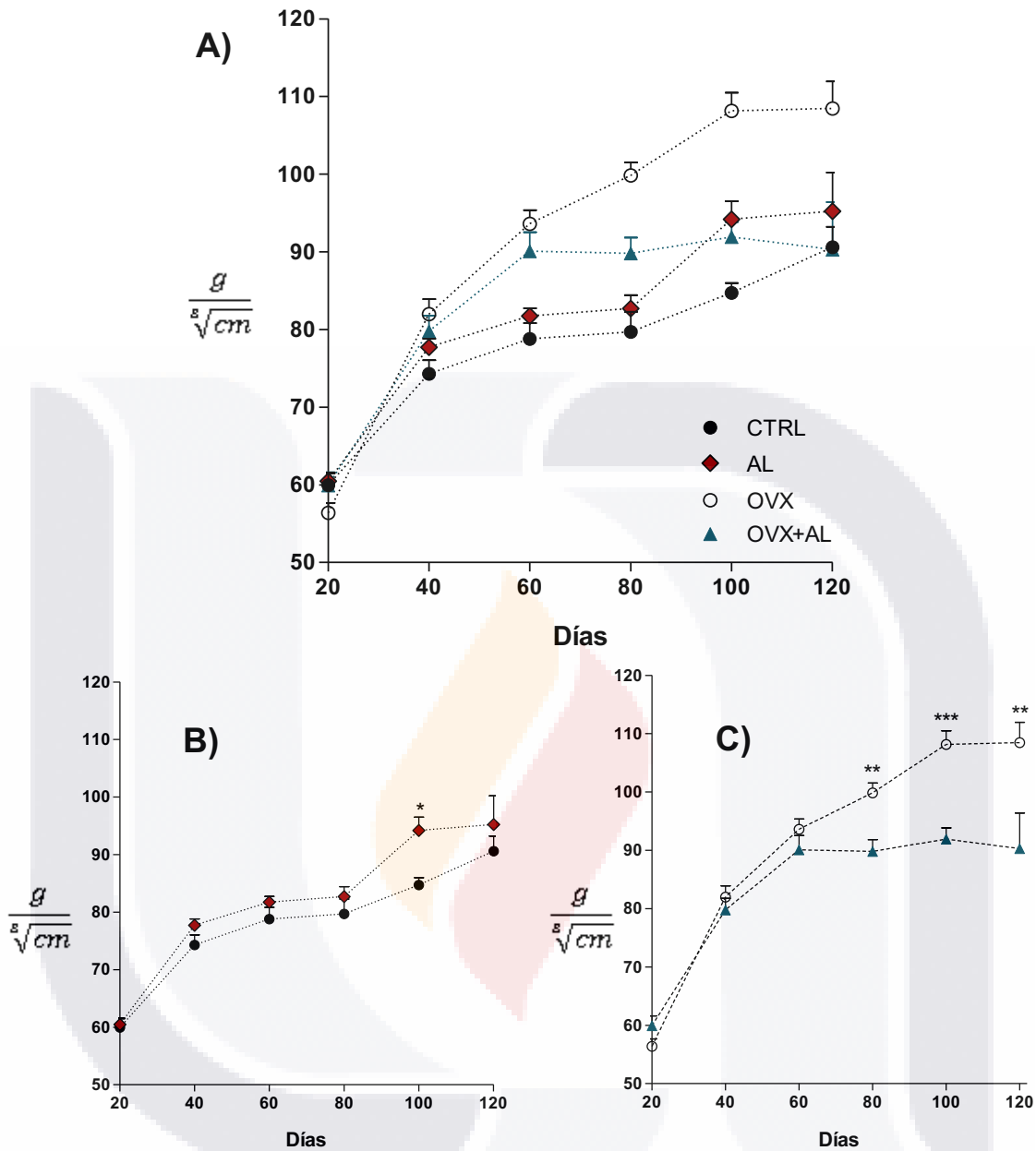
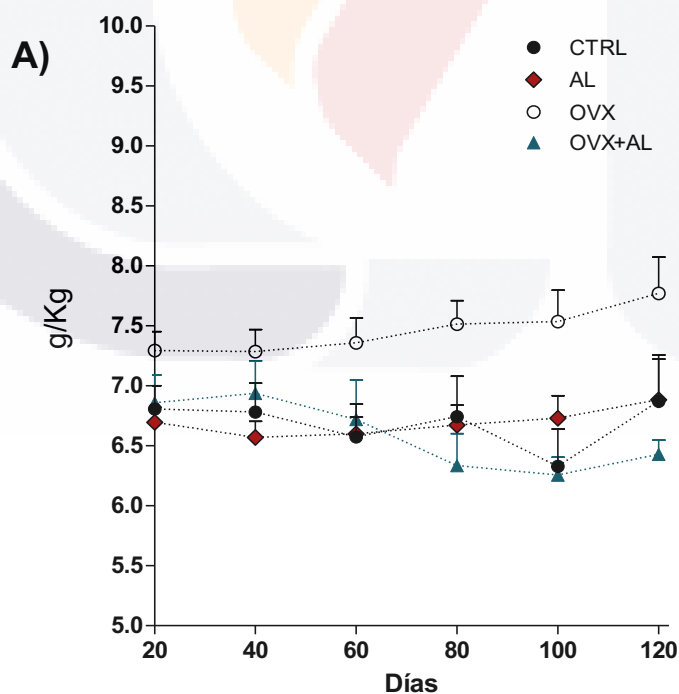


Figura 19. A) Índice Ponderal de los 4 grupos experimentales medido del día 20 al 120. B) El índice ponderal de los grupos CTRL y AL. C) Índice ponderal de los grupos ovariectomizados tratados y no tratados con acetato de leuprolida. Cada punto en los gráficos representa la media y el error estándar de la media. El grupo OVX terminó con un aumento considerable de IP que se manifestó en el tamaño y peso mayor respecto al resto de los grupos. (ANOVA 2V-BONFERRONI, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y $p < 0.001$).

El IP en el grupo AL resultó ligeramente por encima del CTRL pero sin diferencias considerables (Fig. 19-B). En la figura 19-C se muestra el grupo OVX el cual resultó con un índice ponderal mayor a partir del día 60 hasta el día 120, con importante diferencia estadísticamente significativa para los días 80, 100 y 120 (** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$) en comparación del grupo OVX.

5.1.5 Ganancia específica de peso (GEP)

La ganancia específica de peso representa la cantidad de gramos que se incrementó por cada kilogramo de peso del animal en un lapso de tiempo determinado, tomando como referencia el último periodo de registro de peso corporal y el peso actual. Estas determinaciones permiten conocer la tasa de ganancia de peso entre los diferentes periodos de evaluación. Como se puede observar en la figura 20-B la GEP para los grupos CTRL y AL se mantuvo similar a lo largo del experimento, con ganancias de entre 6.5 y 7 g/Kg de peso mientras que los grupos ovariectomizados desde el inicio del experimento muestran GEP de más de 7.5 g/kg de peso lo cual demuestra que en estos últimos grupos de estudio la ganancia de peso fue mayor y por ende un peso corporal aumentado en comparación con los grupos íntegros con y sin tratamiento. La GEP de peso para los grupos OVX y OVX+AL (Fig. 20-C) resultó tener diferencias estadísticamente significativas del día 80 al 120 con valores $p < 0.01$ y $p < 0.001$. Esta diferencia de GEP puede ser atribuido al tratamiento con acetato de leuprolida en el grupo OVX+AL, el cual prácticamente mantuvo constante su ganancia de peso a partir del día 80 hasta el final del experimento en valores muy similares a los grupos íntegros con y sin tratamiento, lo cual podría significar un posible papel del acetato de leuprolida específicamente en los animales ovariectomizados sobre la GEP.



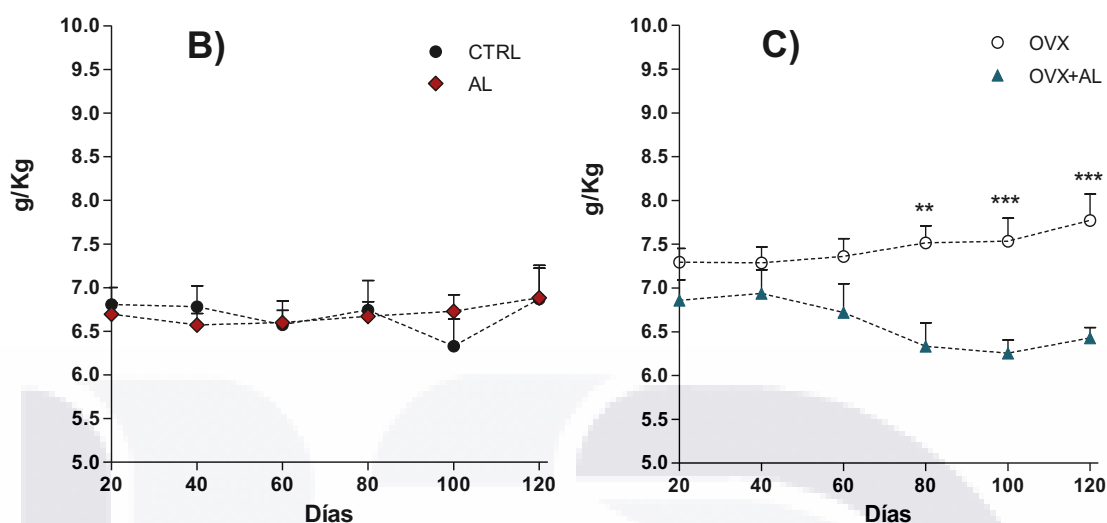


Figura 20. Ganancia específica de peso en gramos (GEP). A) La gráfica muestra el aumento promedio en g/Kg que mantuvieron los diferentes grupos en todo el experimento. B) Comparativo entre el grupo CTRL y AL, la GEP fue similar durante todo el experimento para ambos grupos y C) GEP de los grupos ovariectomizados con y sin tratamiento, se aprecia una mayor GEP para el grupo OVX mientras que el grupo OVX+AL reguló la GEP al final del experimento. (ANOVA 2V-BONFERRONI, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$).

5.2 Determinación de composición corporal

Para la determinación de composición corporal se realizó mediante la aplicación de tres procedimientos metodológicos diferentes, cada una de ellos con diferentes variables a considerar que van desde las determinaciones de peso, talla, índice ponderal, medidas de hidrodensitometría hasta análisis directos como lo es la disección y estudio del análisis químico de masa grasa. Estos procedimientos se tomaron en cuenta para aprovechar al máximo los animales de estudio y de igual forma para tener análisis *in vivo* desde el punto de vista murinométrico y además, con un seguimiento longitudinal. Así mismo, se colectaron datos más precisos sobre la composición corporal una vez realizados los sacrificios de las muestras en los diferentes tiempos de análisis mediante los estudios de disección y de análisis químico de grasa. En conjunto estos datos permitieron una mejor apreciación de los cambios en la composición corporal y establecer correlaciones de forma más puntual.

5.2.1 Porcentaje de masa grasa (MG) por ecuación de Siri

Para la determinación del porcentaje de grasa se utilizó la ecuación de Siri adaptada por Cossio-Bolaños et al., (2011), la cual se calcula a partir de conocer los valores de peso, longitud naso-anal e hidrodensitometría. Los resultados muestran un porcentaje mayor de

masa grasa del inicio al final de la evaluación para los grupos OVX (50.9 %), OVX+AL (38%) y AL (40.7%) en comparación con el grupo control (33%), (Fig. 21).

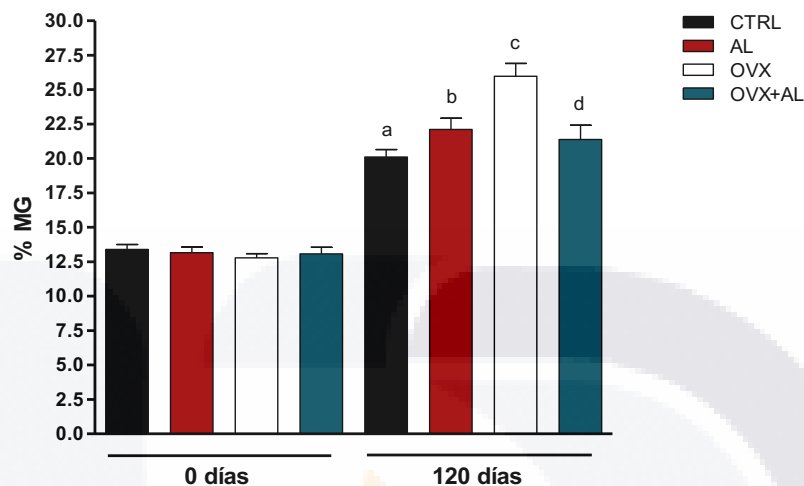


Figura 21. Diferencia entre el porcentaje inicial de MG (0 días) y porcentaje final de MG (120 días) para los grupos de estudio. a) 34 % (CTRL-0 días vs 120días), b) 40.7 % (AL-0 días vs 120 días), c) 49 % (OVX-0 días vs 120 días) y d) 38.6 % (OVX+AL-0 días vs 120 días).

Los mayores aumentos porcentuales de masa grasa se presentaron en los grupos OVX y OVX+AL, esto comparado con los grupos íntegros en las mismas condiciones, sin embargo, en los animales AL resultó con mayores ganancias porcentuales de MG al final del experimento comparado con el grupo CTRL con una diferencia entre ambos de 5.3 % (Fig. 21).

Como referencia de una ganancia de porcentaje de MG en condiciones normales se considera el grupo CTRL, el cual, si se compara con el resto de los grupos se puede observar que hubo un efecto claro a través del tiempo producido por el acetato de leuprolida sobre estos grupos (Fig. 22-A). El grupo AL mantuvo diferencias importantes de mayor porcentaje de MG comparado con el grupo CTRL de 4-6 % más prácticamente desde el día 60-120 (Fig. 22-B). Los grupos OVX y OVX+AL resultaron con mayor porcentaje de MG respecto a los grupos íntegros a partir del día 40 al 80 y cabe resaltar que en los últimos tres periodos de evaluación el grupo OVX+AL se mantuvo constante, es decir, no cambió su porcentaje de MG hasta el final del experimento o al menos tuvo mínimas variaciones (Fig. 22-C).

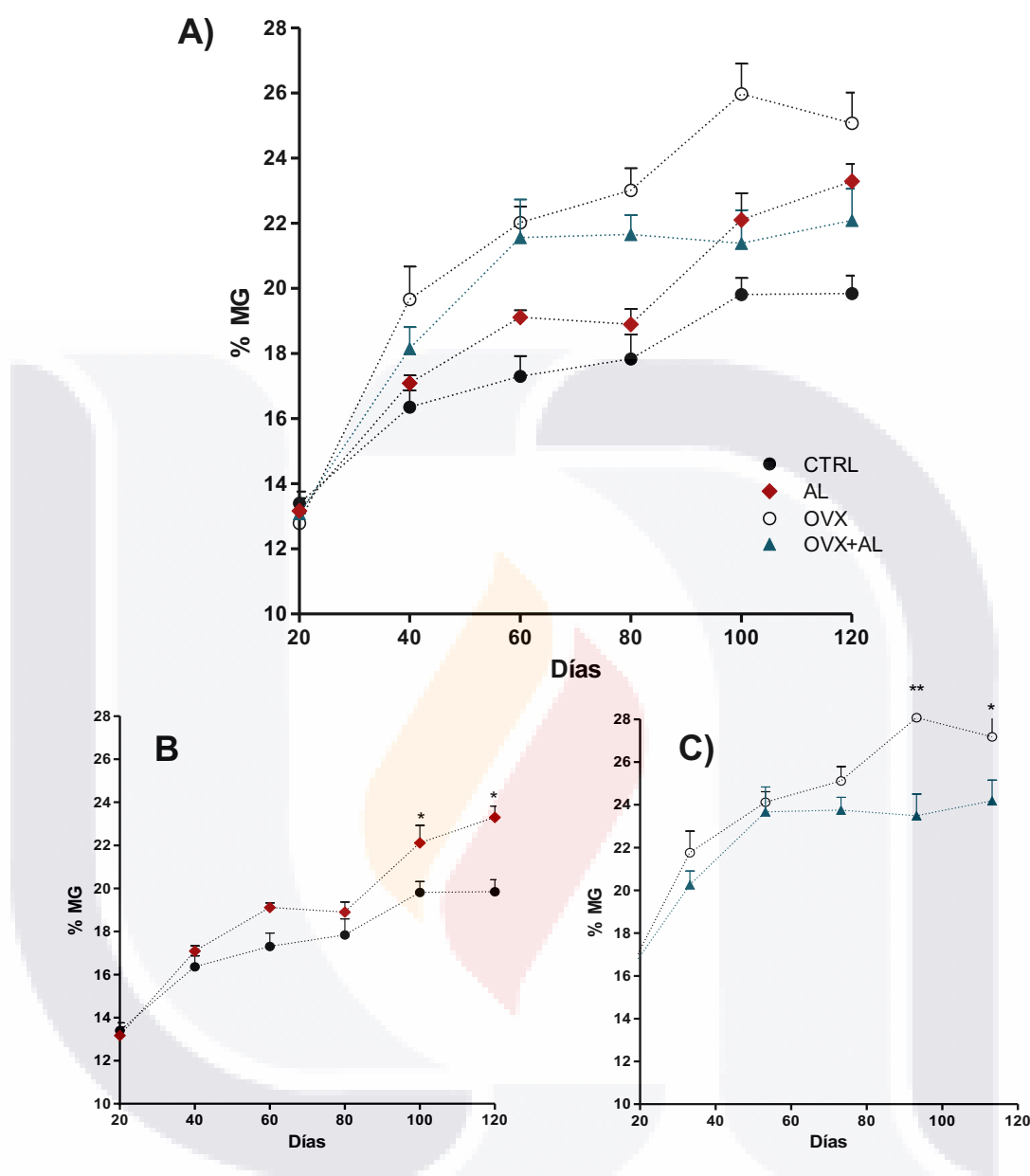


Figura 22. A) Porcentaje de masa grasa (% MG) mediante la ecuación de Siri para los grupos. B) Análisis comparativo del % MG del grupo CTRL y AL. C) Análisis comparativo entre el grupo OVX vs OVX+AL del %MG. Cada punto representa la media y error estándar de la misma (ANOVA 2V-BONFERRONI, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

5.2.2 Masa libre de grasa (MLG) por ecuación de Siri

La MLG en la mayoría de los mamíferos es mayor en etapas posnatales y edad temprana en comparación con la MG respecto a etapas adultas, a medida que avanza el desarrollo y crecimiento de estos organismos la MLG se aminora por la pérdida de agua principalmente y también, la ganancia paulatina de peso en forma de tejido adiposo. En la

figura 23 se muestran los resultados de la MLG para todos los grupos experimentales en la cual se aprecian valores porcentuales similares desde el inicio del tratamiento hasta los 80 días y durante este lapso se puede observar que independientemente del tratamiento existe un mayor porcentaje de MLG para grupos íntegros (CTRL y AL) en comparación con los OVX y OVX+AL (Fig. 23 B, C).

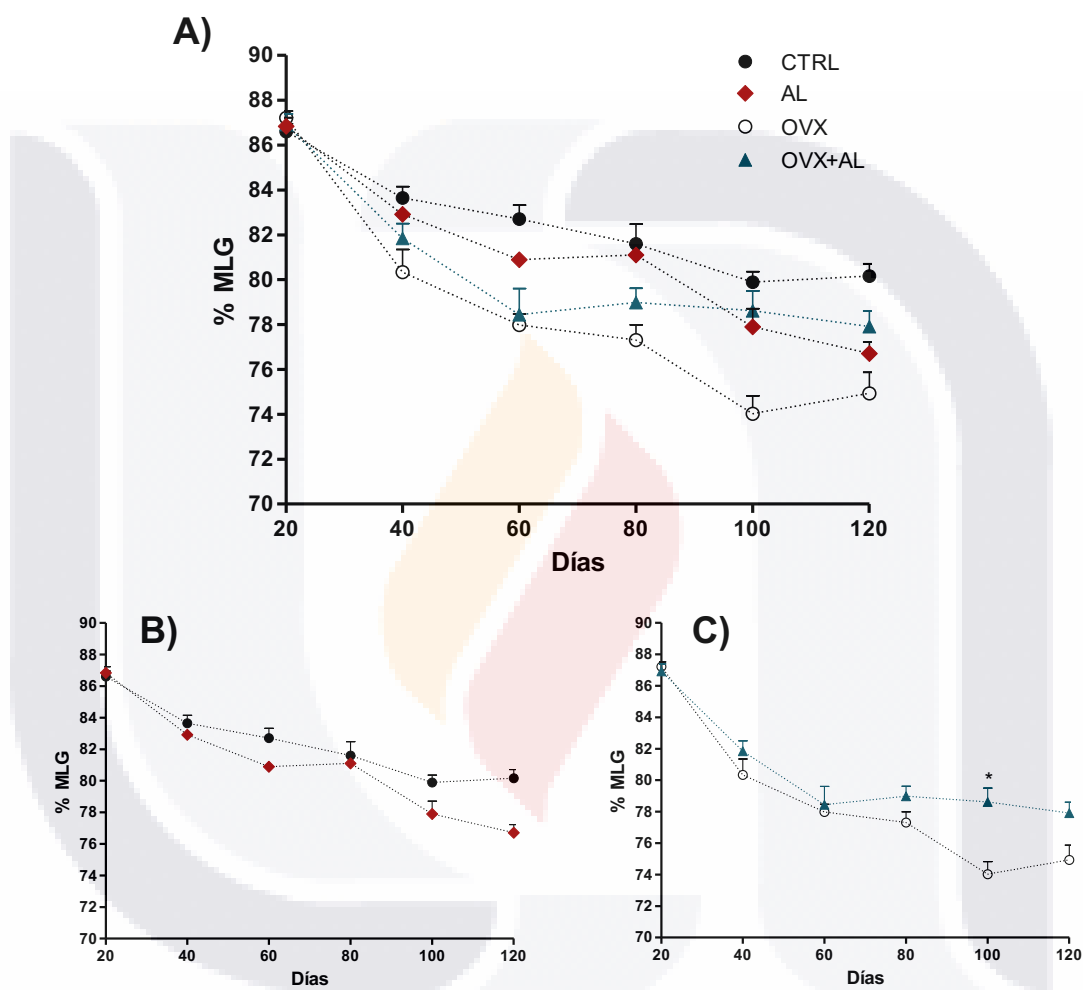


Figura 23. A) Porcentaje de MLG de los grupos íntegros y ovariectomizados con y sin tratamiento en los diferentes periodos de evaluación experimental. B) Porcentaje de MLG entre el grupo CTRL y AL. C) Porcentaje de MLG entre el grupo OVX y OVX+AL. Cada punto representa la media y error estándar de la misma (ANOVA 2V-BONFERRONI, * $p < 0.05$).

En los resultados finales (día 120) de esta variable se puede apreciar que los grupos CTRL y AL resultaron con pérdidas porcentuales de MLG al final del experimento de 7.3 % y 11.6 % respectivamente (Fig. 23-B), esto es tomando como referencia el porcentaje de MLG obtenido al inicio del estudio, además de que no se obtuvieron diferencias

estadísticamente significativas entre ambos. Mientras que el grupo OVX resultó con pérdidas de MLG al final del experimento de 14.1 % en comparación al porcentaje inicial, prácticamente el doble comparado con el grupo CTRL. Cabe resaltar que el grupo OVX+AL presentó sólo una reducción porcentual de la MLG de 10.2 %, un valor incluso ligeramente inferior al grupo AL con 11.6 % y esta tendencia se observa prácticamente a partir del día 80 de tratamiento (Fig. 23 B, C). Este resultado podría significar un posible papel del acetato de leuprolida en la disminución de la pérdida de MLG progresiva en animales ovariectomizados.

5.3 Determinación de composición corporal mediante indicadores murinométricos

5.3.1 Masa grasa por murinometría (MGm)

Los resultados a continuación fueron calculados de a partir de determinaciones de las diferentes dimensiones corporales y mediante ecuaciones basadas en estudios previos de composición corporal de ratas. Con la aplicación de este segundo método, se buscó comprobar similitud de los datos obtenidos previamente utilizando la ecuación adaptada de Siri, la cual para fines prácticos utiliza indicadores más precisos como lo es la densidad corporal. Cabe señalar que el siguiente método utiliza variables como la longitud del animal, peso e índice ponderal.

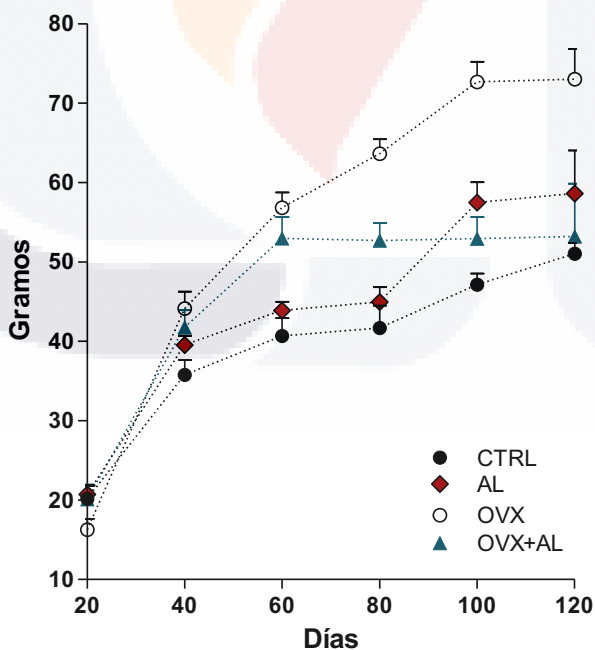


Figura 24. Análisis general de los gramos de masa grasa calculados por murinometría (MGm) de todos los grupos experimentales durante 120 días. Cada punto en la gráfica representa la media y el error estándar de la media.

Los resultados arrojaron una ganancia de MGm para todos los grupos al final del experimento sin embargo, tomando como referencia el grupo CTRL el cual en términos generales es aquel grupo que representa la referencia de ganancia normal de MGm, es claro notar que el resto de los grupos presentaron resultados diferentes entre sí, según las condiciones experimentales de cada uno (Fig. 24).

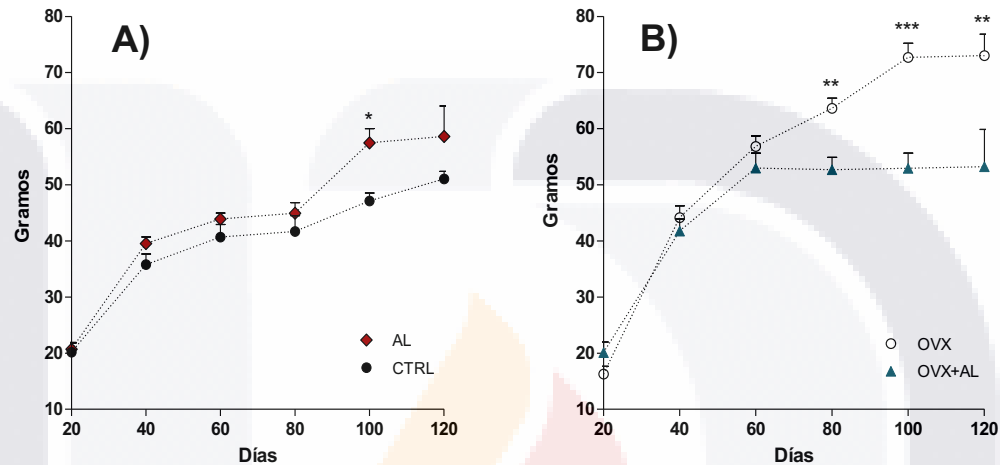


Figura 25. A) Análisis comparativo de MGm para los grupos CTRL vs AL. C) Análisis comparativo de MGm para los grupos OVX vs OVX+AL. Cada punto en los gráficos representa la media y el error estándar de la media. (ANOVA 2V-BONFERRONI, ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05).

El grupo AL durante todo el experimento, presentó ligeros incrementos de MGm en los diferentes periodos de evaluación y con mayor diferencia al grupo CTRL al final del experimento en los días 100 y 120, en tales casos el incremento porcentual al final del experimento en comparación con los valores obtenidos al inicio del mismo fueron de 60.5 % y 64.6 % para los grupos CTRL y AL respectivamente (Fig. 25-A). Por otra parte, el grupo OVX presentó un incremento de MG considerable al final del experimento en comparación con el determinado al día 20 con un 77 % de aumento en comparación con el grupo OVX+AL con un 62.4 % y prácticamente diferencias estadísticamente significativas desde el día 80 al 120 del experimento (Fig. 25-B, tabla 8).

Tabla 8. Diferencias de MGm para los grupos CTRL vs AL y OVX vs OVX+AL en los días 80, 100 y 120.

Grupo	Día 80		Día 100		Día 120	
CTRL	41.6 ± 2.8	ns	47.1 ± 1.1	p < 0.05	51.0 ± 1.3	ns
AL	44.9 ± 1.8		57.4 ± 2.5		58.6 ± 5.4	
OVX	63.6 ± 1.8	p < 0.01	72.6 ± 2.5	p < 0.001	72.9 ± 3.8	p < 0.01
OVX+AL	52.6 ± 2.2		52.9 ± 2.7		53.2 ± 6.6	

Durante este lapso, el grupo OVX+AL no incrementó su MGm del mismo modo que ocurrió con el grupo OVX y además, se mantuvo con valores que pueden considerarse normales, esto si se compara con el grupo CTRL. Es posible que el tratamiento en estos animales redujo considerablemente su incremento de peso en forma de grasa conservando la ganancia de MLGm.

5.3.2 Masa libre de grasa por murinometría MLGm

Cuando la MLG es expresada en gramos y no términos porcentuales en estudios longitudinales, el comportamiento natural es observar incrementos del componente a través del tiempo, a diferencia de cuando se expresa porcentualmente en donde ocurre lo contrario, este disminuye. Dependiendo de las condiciones experimentales los resultados pueden ser variables y la ganancia de MLG puede aumentar o disminuir. En la figura 26 se puede observar el comportamiento de la ganancia de MLGm que tuvieron los grupos experimentales, todos con un incremento considerable. En grupos íntegros como lo son CTRL y AL las diferencias en la MLGm entre ambos resultó tener variaciones de entre 10 a 20 g desde el día 80 hasta el 120. El grupo AL mantuvo mayor ganancia de MLGm en la parte final del experimento (Fig. 27-A, tabla 9).

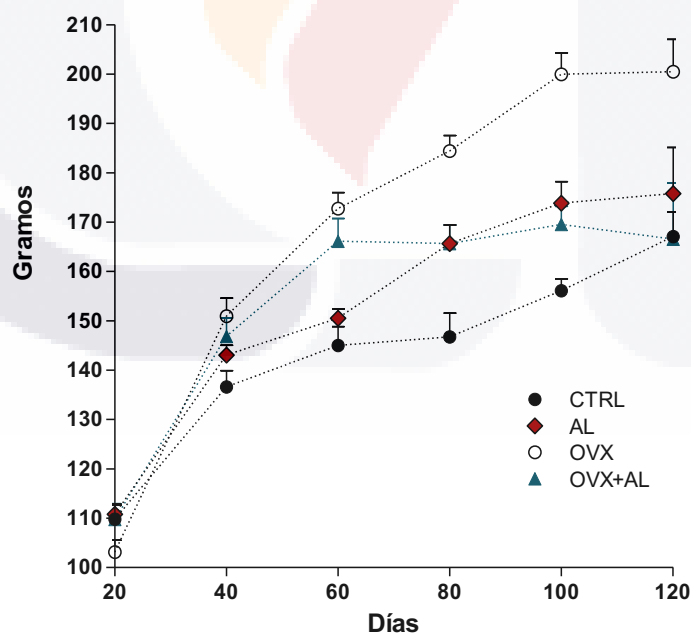


Figura 26. Resultados de MLGm obtenidos para todos los grupos experimentales obtenida durante todo el experimento. Cada punto representa la media y el error estándar de la misma.

Tabla 9. Diferencias de MLGm para los grupos CTRL vs AL y OVX vs OVX+AL en los días 80, 100 y 120.

Grupo	Día 80		Día 100		Día 120	
CTRL	146.7 ± 4.8 g	p < 0.01	156.0 ± 1.1 g	p < 0.05	167.0 ± 4.9 g	ns
AL	165.6 ± 3.8 g		173.8 ± 4.3 g		175.7 ± 9.3 g	
OVX	184.3 ± 3.1 g	p < 0.01	199.9 ± 4.3 g	p < 0.001	200.4 ± 6.5 g	p < 0.01
OVX+AL	165.6 ± 3.8 g		169.5 ± 3.6 g		166.5 ± 1.4 g	

Los grupos OVX y OVX+AL resultaron con diferencias importantes entre ambos del día 80 al 120, el mayor incremento de MLGm fue para el grupo OVX con un 48.6 % final mientras que OVX+AL terminó con un incremento de 32 % final, valor porcentual que prácticamente conservó desde el día 60 al 120 con mínimas variaciones (Fig. 27-B, tabla 8). Un resultado que deja entrever el papel del acetato de leuprolida sobre la MLGm en animales ovariectomizados.

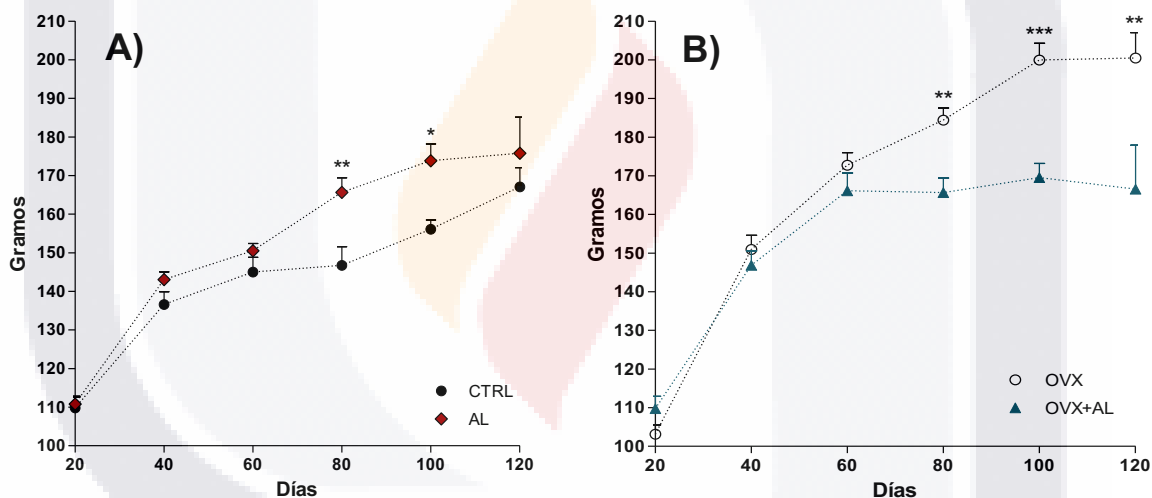


Figura 27. A) Comparativa de MGm para los grupos CTRL vs AL. B) Comparativa de MGm para los grupos OVX vs OVX+AL. Cada punto representa la media y el error estándar de la misma. (ANOVA 2V-BONFERRONI, ***p<0.001, **p<0.01, p<0.05).

5.4 Estudio de la composición corporal mediante disección

Existen métodos proximales que se basan únicamente en la textura del organismo y sus dimensiones (masa y longitud), frecuentemente estas aproximaciones resultan inconsistentes y difíciles de comprobar. Hasta el momento se han mostrado resultados de variables de composición corporal basadas en cálculos indirectos que utilizan variables murinométricas y estudios de hidrodensitometría, los cuales, tienen validez ya que pueden ser utilizados en un estudio longitudinal donde el organismo puede ser evaluado en

diferentes lapsos de tiempo. En el siguiente apartado se describen los resultados obtenidos a partir de muestras representativas por periodos de evaluación ($n=4 \pm 1$ para cada grupo) lo cual implica un método directo de análisis de composición corporal con el que es posible validar las determinaciones realizadas *In vivo* y que además representa un análisis de mayor precisión.

5.4.1 Peso de la piel

Los resultados que se presentan a continuación constituyen el peso de la piel disecada de cada animal la cual, es considerada como el órgano con mayor distribución de grasa corporal en comparación con el resto del organismo. El peso de la piel resultó levemente mayor en el grupo AL sobre el grupo CTRL en la mayor parte del experimento pero con diferencias estadísticamente significativas sólo hasta los días 100 (CTRL 28.5 ± 0.3 g vs AL 36.2 ± 1.06 g; $p < 0.05$) y 120 (CTRL 28.4 ± 0.9 g vs AL 38.6 ± 2.3 g; $p < 0.05$) del experimento (Fig. 28). En cuanto a los grupos OVX y OVX+AL el peso de la piel fue muy similar en los diferentes periodos de evaluación aunque ambos grupos resultaron con los mayores valores de peso de la piel en comparación con los grupos íntegros (Fig. 29 A, B).

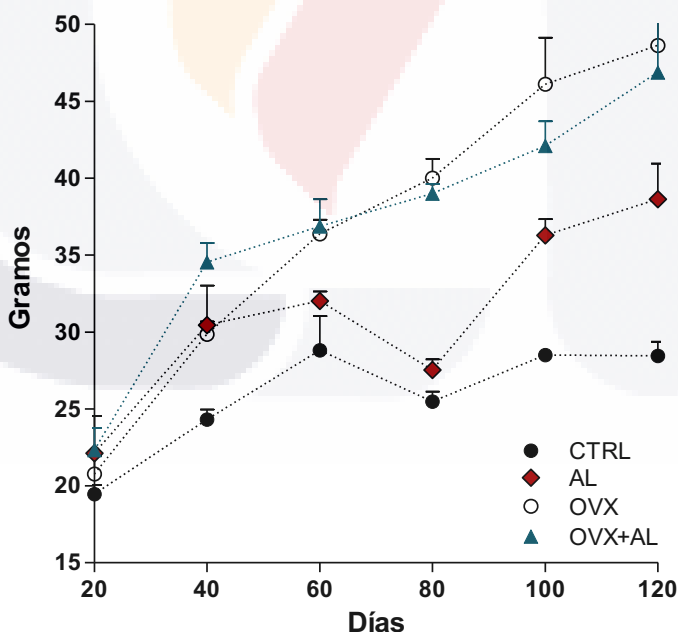


Figura 28. Vista general de los resultados de peso de la piel disecada en gramos para todos los grupos experimentales durante todo el experimento. Cada punto representa la media y el error estándar de la misma ($n=4$).

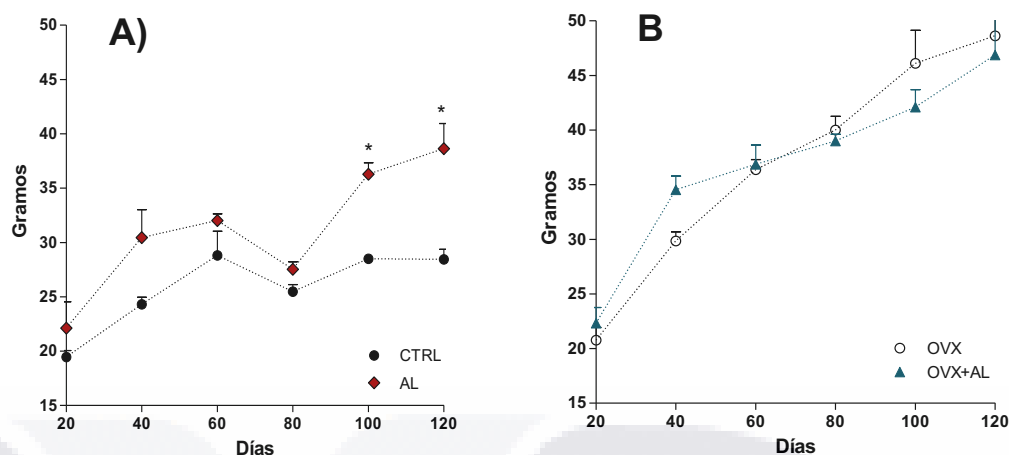


Figura 29. A) Resultados de peso de la piel disecada en gramos para los grupos CTRL y AL. B) Peso de la piel disecada para los grupos OVX y OVX+AL. Cada punto en la gráfica representa la media y el error estándar de la misma, n= 4 (ANOVA 2V-BONFERRONI, * $p<0.05$).

5.4.2 Peso de la carcasa

Un componente altamente representativo de la MLG es el peso de la carcasa y esta corresponde al peso de cada animal totalmente eviscerado y sin tejido cutáneo. Como era esperado el peso de la carcasa cambió para todos los grupos dependiendo de las condiciones experimentales (Fig. 30).

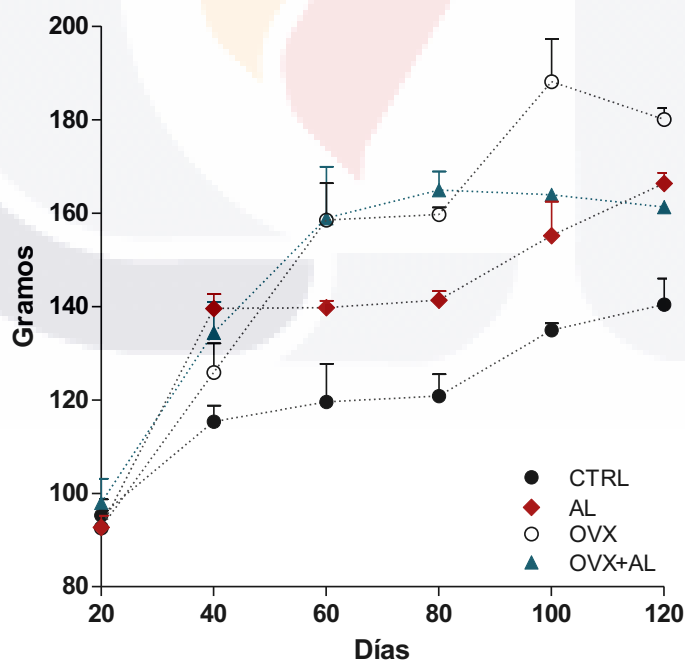


Figura 30. Vista general de los resultados obtenidos de peso de la carcasa para todos los grupos en todo el experimento. Cada punto representa la media y el error estándar de la misma (n=4).

Un resultado a destacar es el que se observa en la figura 31-A en donde se compara el grupo CTRL vs AL durante todo el experimento y es notable un mayor peso de la carcasa del grupo CTRL sobre el grupo AL en prácticamente todo el experimento con diferencias estadísticamente significativas y un peso final de carcasa de 32 % y 44.2 % mayor respecto al inicio del experimento para el caso del grupo CTRL (95.2 ± 3.4 g; día 20 vs 140.3 ± 5.6 g día 120) y el grupo AL (92.7 ± 2.2 g; día 20 vs 166.3 ± 2.5 g; día 120) respectivamente.

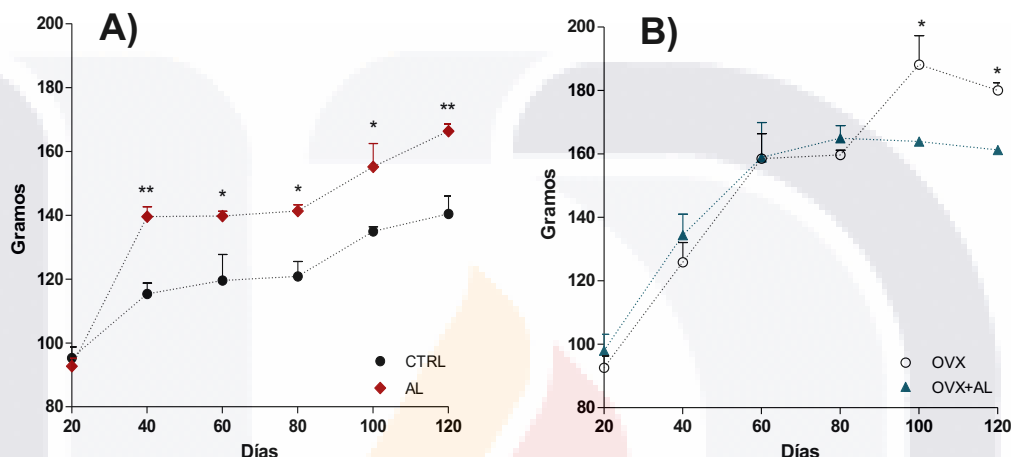


Figura 31. A) Resultados del peso de la carcasa con diferencias estadísticamente significativas entre el grupo CTRL y AL, las cuales se observan prácticamente desde los días 40 al 120. B) Análisis comparativo del peso de la carcasa del grupo OVX vs OVX+AL. Cada punto representa la media y el error estándar de la misma n=4, (ANOVA 2V-BONFERRONI, ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05).

Cabe señalar además, que el grupo AL terminó con un peso final de carcasa ligeramente por encima el grupo OVX+AL del cual, se esperaba hipotéticamente que finalizara con el mayor registro de peso de carcasa sobre el resto de los demás grupos de estudio. Los resultados de los grupos OVX y OVX+AL fueron similares en el peso de la carcasa en buena parte del experimento (día 20-80) y únicamente en los dos últimos periodos de evaluación resultaron estadísticamente diferentes entre sí, con un mayor peso de la carcasa para el grupo OVX en los días 100 y 120 de evaluación (Fig. 31-B). Al final del estudio el grupo OVX tuvo un incremento de 48 % de peso de la carcasa (92.5 ± 3.7 g; día 20 vs 180 ± 2.3 g; día 120) respecto al inicio, mientras que el grupo OVX+AL su incremento final fue de 39.2 % (97.9 ± 5.1 g; día 20 vs 161.2 ± 1.2 g; día 120).

5.5 Análisis químico de lípidos totales en piel

Como se esperaba, la cantidad de lípidos totales en piel fue directamente proporcional al peso de donde fueron extraídas, a mayor peso en piel, mayor fue la concentración de lípidos totales obtenidos. Al igual que ocurrió con los resultados de peso de la piel (Fig. 28, 29-B), los grupos OVX y OVX+AL mantuvieron incrementos importantes en la mayor parte del experimento y finalizaron con los porcentajes de lípidos totales en piel más altos con un 66 % y 50 % respectivamente, esto con referencia a los valores iniciales del experimento (Fig. 32).

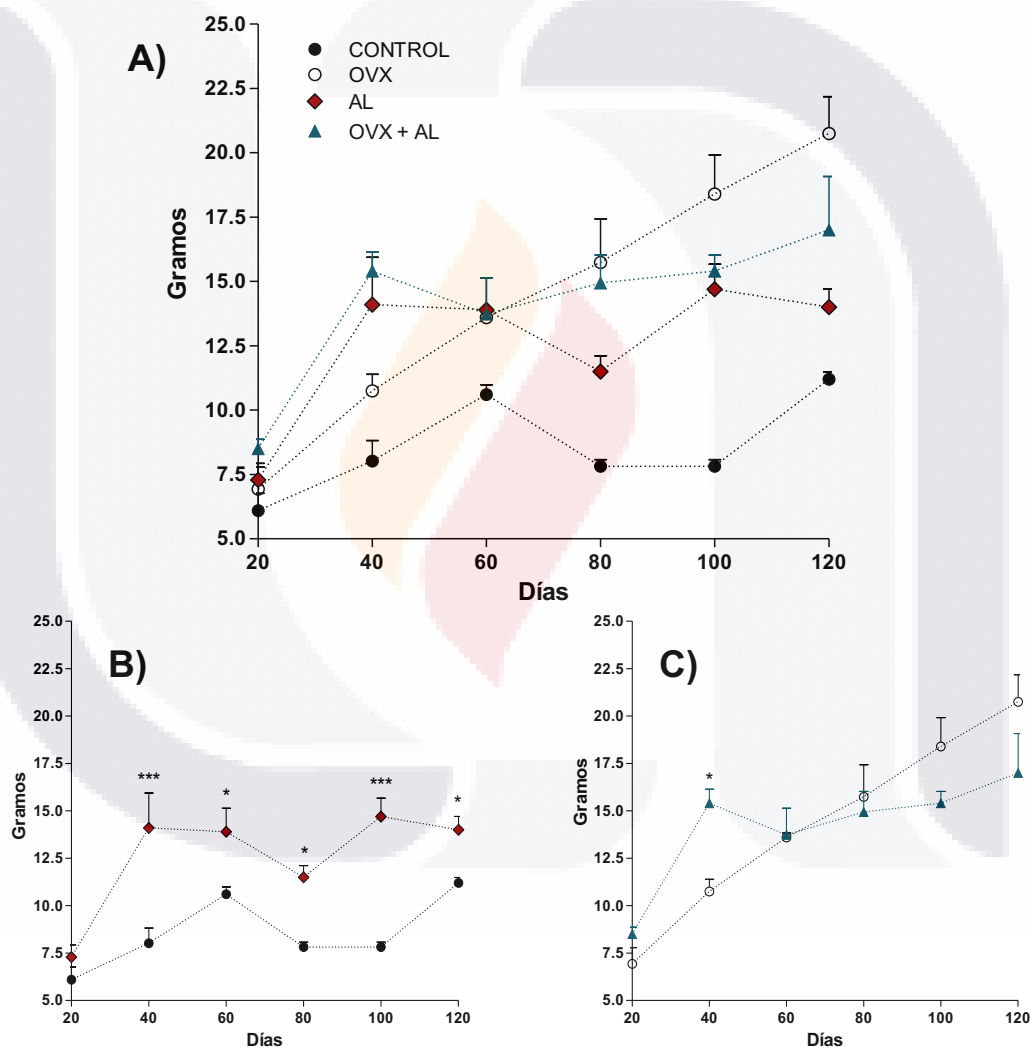


Figura 32. A) Gramos de lípidos totales en piel de todos los grupos a partir de extracción con metanol:cloroformo. B) Análisis comparativo entre el grupo CTRL y AL. El grupo AL mantuvo mayor cantidad de lípidos extraídos en piel a partir del día 4 hasta el 120. C) Análisis comparativo de lípidos en piel entre el grupo OVX y OVX+AL, los cuales, finalizaron con los mayores niveles. Cada punto representa la media y el error estándar de la misma n=4, (ANOVA 2V-BONFERRONI, ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05).

El grupo AL resultó tener mayor cantidad de lípidos extraídos en piel desde el día 40 hasta el 120 que el grupo CTRL, con una diferencia estadísticamente significativa de entre 4-6 g por periodo de evaluación (Fig. 32-B). El grupo OVX en este sentido, tuvo un aumento con comportamiento logarítmico desde el inicio del experimento finalizando con un 65.8 % mayor de lípidos totales en piel respecto al inicio. El grupo OVX+AL finalizó con un 52.9 % más que al inicio, lo cual indica que a pesar de que el peso total en piel para ambos grupos fue muy similar en todo el experimento, la cantidad de lípidos extraídos fue mayor en el grupo OVX (Fig. 29-B, 32-C). Sin embargo, a pesar de esta observación la relación entre el peso total de la piel y los lípidos extraídos de cada muestra resultó proporcional para todos los ensayos realizados, esto se demostró con un análisis de regresión lineal (Fig. 33).

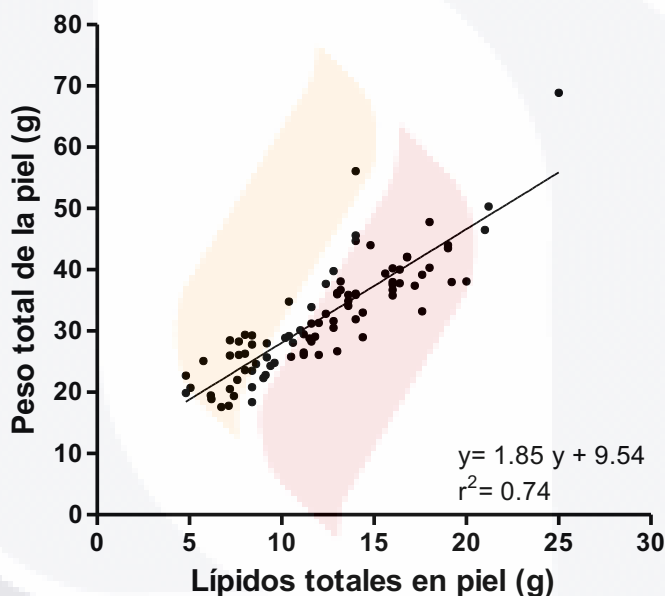


Figura 33. Análisis de regresión entre el peso total de la piel disecada (g) y los lípidos totales en piel (g) para todas las muestras obtenidas del experimento ($r^2 = 0.74$, $p < 0.001$). Cada punto representa la relación entre el peso de la piel y la cantidad de lípidos presentes del total de muestras del experimento.

Una vez demostrado lo anterior, se realizó un nuevo análisis de regresión, pero ahora para saber si existía cierta proporcionalidad entre el índice ponderal (IP) es decir, la complexión del animal y la cantidad de lípidos totales en piel (Fig. 34). Tal regresión se elaboró comparando el promedio por sacrificio para cada grupo contra la media de los lípidos en piel obtenidos de igual forma, por grupo y sacrificio. El análisis indicó en efecto, que a mayor IP mayor era la cantidad de lípidos presentes en piel. El grupo OVX representó una linealidad constante desde el inicio del experimento hasta el final mientras que los

grupos AL y OVX+AL resultaron similares en este mismo análisis y con la ubicación de sus puntos muy próximos entre sí. Como era esperado, los puntos del grupo CTRL se resultaron como aquellos que representaron los mínimos valores del análisis.

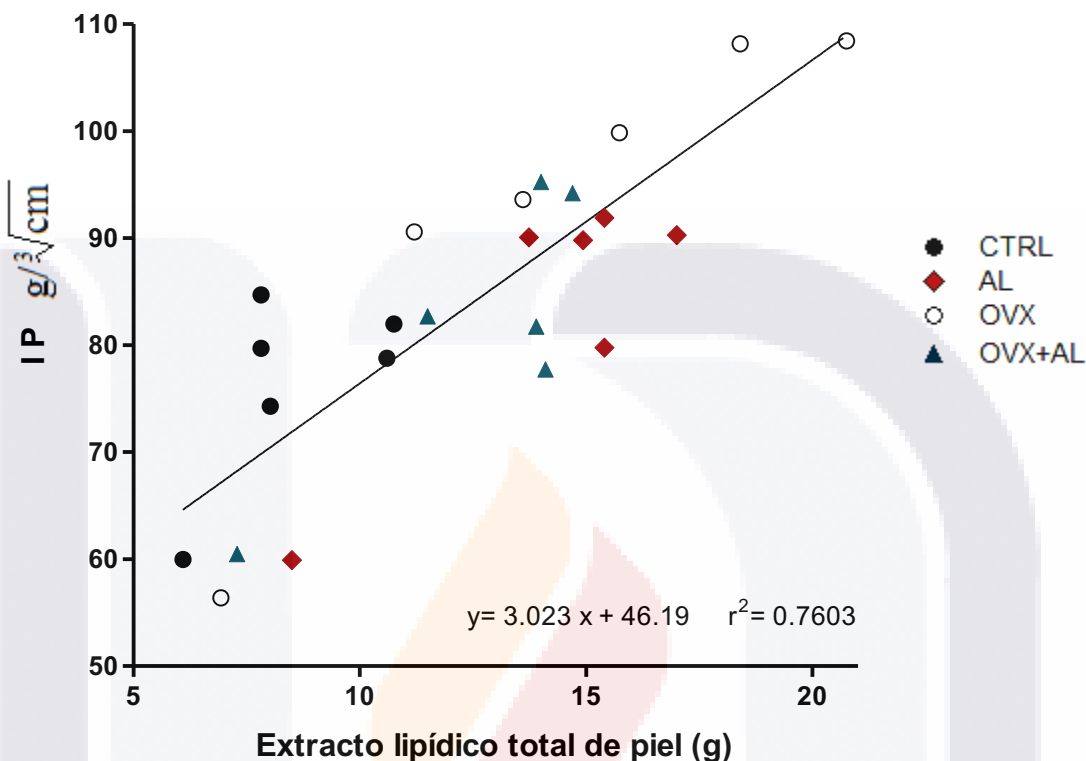


Figura 34. Análisis de regresión entre el extracto lipídico total de piel (g) y el índice ponderal. Cada punto representa el análisis comparativo entre las medias de ambas variables por grupo y periodo de sacrificio ($r^2 = 0.76$, $p < 0.001$).

5.6 Validación de los estudios de composición corporal

Para confirmar que los resultados de composición corporal que se obtuvieron a partir de 3 tipos de ensayos fueron obtenidos de forma adecuada y además demostrar la confiabilidad de los mismos, se realizó un análisis de correlación de los componentes principales de la composición corporal (MG y MLG) entre el método más preciso y directo que es la disección de la muestra y aquellos calculados de forma indirecta mediante las ecuaciones adaptadas de Siri y por estudios de murinometría. En la figura 35-A se muestra una correlación entre las medias obtenidas para todos los grupos de los 0-120 días de MG obtenida por la ecuación de Siri (MG-s) y la que fue obtenida por disección (MG-d), un método *In vivo* y uno *Post mortem* con una $r = 0.90$ y una $p < 0.001$, tal y como se observa, existe una similitud muy alta entre ambas metodologías. En la misma figura en el apartado

B, se realizó un análisis similar esta vez comparando la correlación de datos obtenidos para el cálculo de MG-s y aquel que fue obtenido por murinometría MG-m en cual se observó una correlación positiva y estadísticamente significativa ($r = 0.89$, $p < 0.001$).

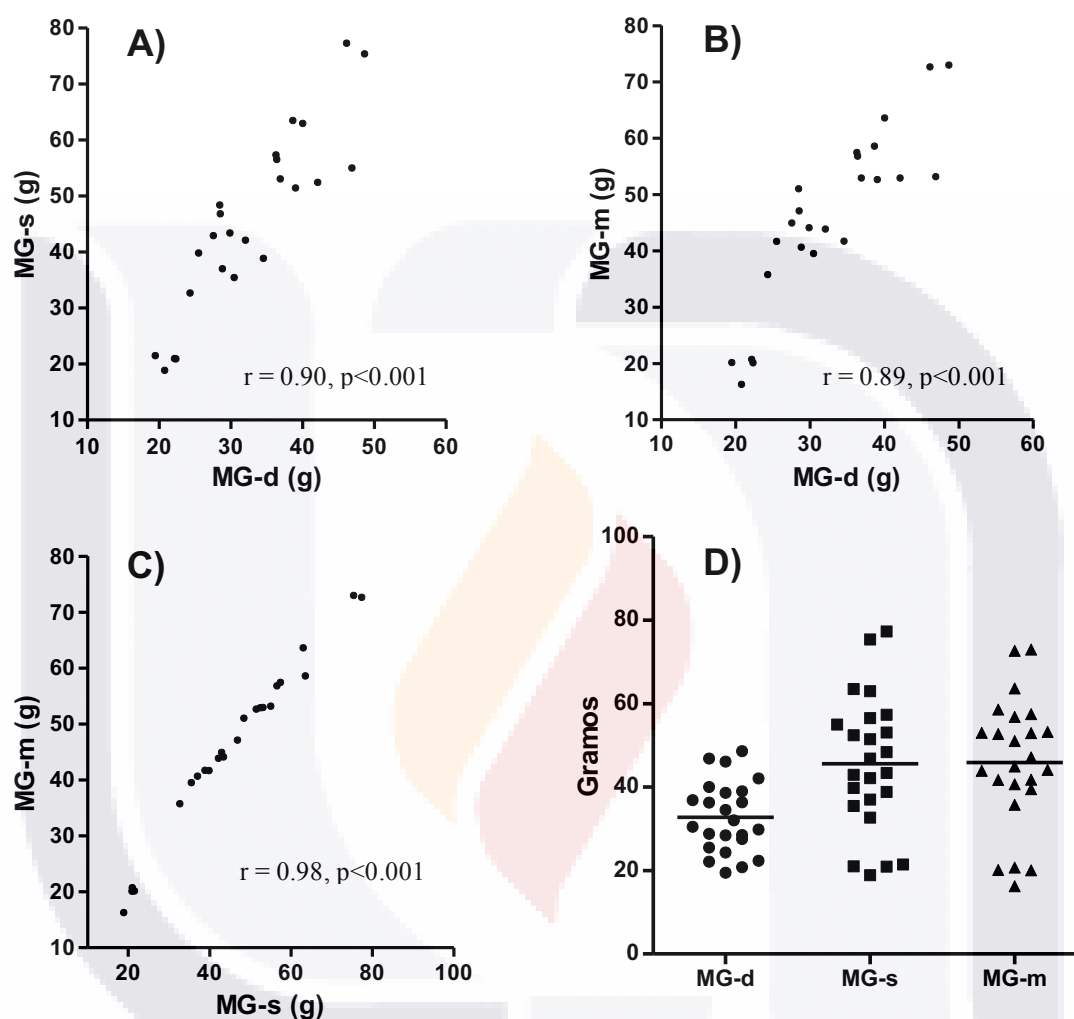


Figura 35. Correlaciones de las medias de los diferentes métodos de cálculo de MG expresado en gramos desde los 20 hasta los 120 días. A) Correlación positiva (Pearson $r = 0.90$) entre la MG calculada por ecuación de Siri (MG-s) y MG calculada por disección (MG-d). B) Correlación positiva entre la MG obtenida por murinometría (MG-m) y la MG-d (Pearson $r = 0.89$). C) Correlación positiva entre los dos métodos *in vivo* MG-m y MG-s (Pearson $r = 0.98$). D) Dispersión de las medias obtenidas para los tres métodos de análisis de MG para todos los grupos de los 0 a 120 días.

Se encontró de igual forma, que la correlación entre los métodos de cálculo de masa grasa *in vivo* (MG-m y MG-s), resultó ser positiva y con una significancia estadística importante ($r = 0.98$, $p < 0.001$), (Fig. 35-C). Para poder interpretar de mejor forma estas correlaciones, se realizó una dispersión de las medias de los tres métodos de obtención de MG (MG-d, MG-s y MG-m) en la cual, se observó una distribución muy similar entre las tres

metodologías que corresponden ampliamente a lo observado en las gráficas de correlación. Las dispersiones que resultaron tener gran similitud fueron las realizadas para MG-s y MG-m que a pesar de utilizar diferentes variables para su cálculo, los resultados fueron consistentes (Fig. 35-D).

En este mismo sentido, se realizaron los mismos análisis para los resultados obtenidos de MLG bajo las mismas condiciones.

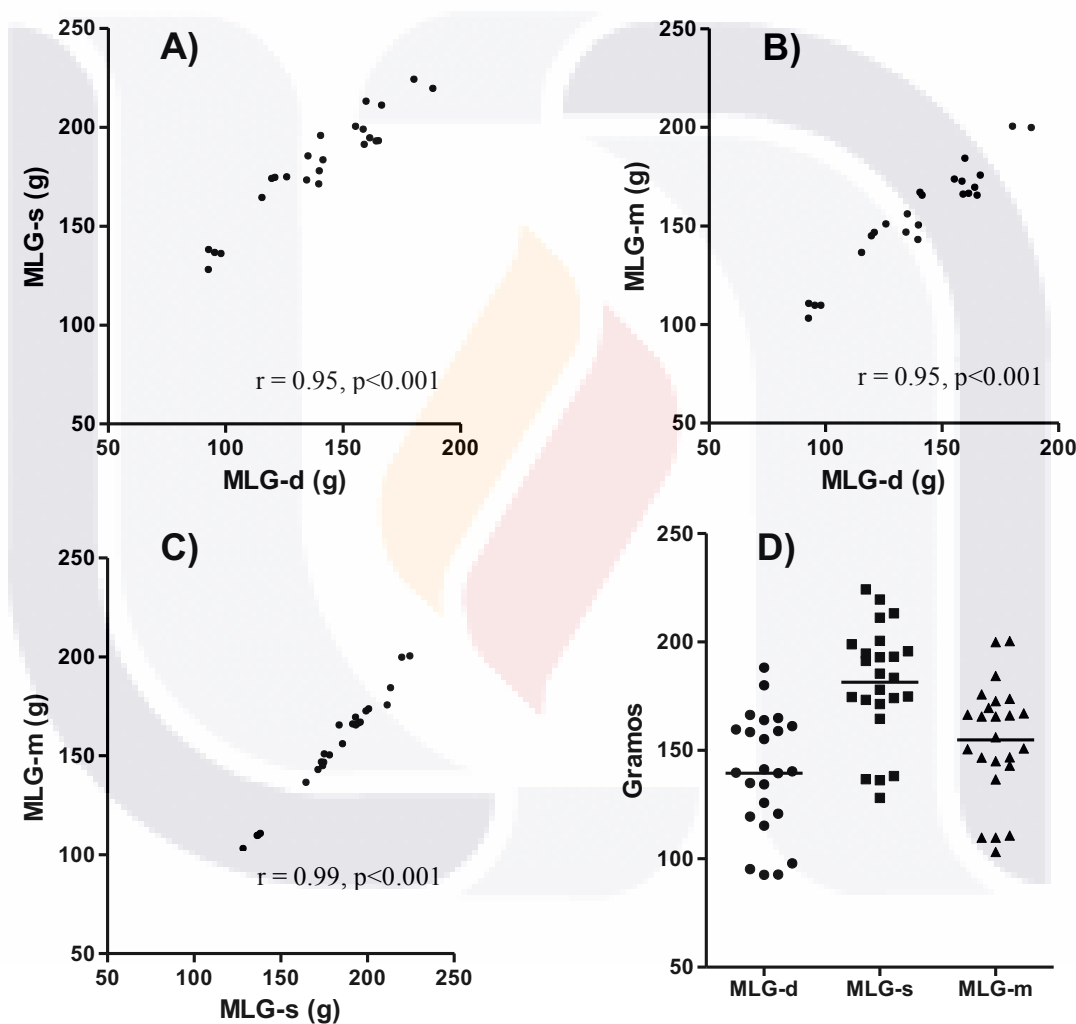


Figura 36. Correlaciones de las medias de todos los grupos experimentales de MLG expresada en gramos desde los 20 hasta los 120 días para las tres metodologías. A) Correlación entre los gramos de masa libre de grasa obtenidos mediante la ecuación de Siri (MLG-s) y por disección (MLG-d), (Pearson $r = 0.95$). B) Correlación entre MLG-d y MLG-m (Pearson $r = 0.95$). C) Correlación positiva entre MLG-m y MLG-s (Pearson, $r = 0.99$). D) Dispersión de las medias obtenidas para los tres métodos de análisis de MLG para todos los grupos de los 0 a 120 días.

En estos análisis se pudo comprobar la alta correlación entre los métodos de cálculo de MLG por los 3 métodos aplicados en este experimento (Fig. 36). La correlación entre los datos obtenidos mediante los métodos *in vivo* MLG-s y MLG-m con los datos de MLG-d resultaron en valores muy similares con una $r = 0.95$ y $p < 0.001$ en ambos casos (Fig. 36-A, B). Los resultados del mismo análisis entre los métodos *in vivo* (MLG-s y MLG-m), mostraron una alta correlación con una $r = 0.99$ y $p < 0.001$ (Fig. 36-C). En la dispersión de la medias de las tres metodologías de cálculo de MLG se pueden observar que los datos están ubicados en posiciones muy similares con variaciones en la media de cada ensayo (Fig. 36-D).

Lo anterior indica que las técnicas de estudio *In vivo* seleccionadas para este experimento, son altamente reproducibles y que el cálculo de ambos componentes (MG y MLG) mediante estas metodologías es válido ya que a pesar de que cada técnica implica utilizar diferentes variables, los resultados siempre fueron consistentes y con una similitud amplia.

5.7 Estudio de intercambio respiratorio

Los resultados de intercambio respiratorio se calcularon midiendo la frecuencia de consumo de oxígeno y producción de bióxido de carbono por unidad de tiempo. A partir de estas frecuencias se determinó el coeficiente respiratorio que se deriva de la relación de oxígeno y bióxido de carbono que se intercambia (VCO_2/VO_2), este valor es adimensional pero sirve para determinar la tasa metabólica y la principal fuente de oxidación biológica que utiliza el organismo para la obtención de energía.

5.7.1 Frecuencia de consumo de oxígeno

La frecuencia de consumo de oxígeno resultó ser mayor en los grupos AL, OVX y OVX+AL en comparación con el grupo CTRL, esto se observó a partir del día 40 hasta el final del experimento (Fig. 37-A). Durante este periodo fue cuando entre el grupo CTRL y AL se presentaron diferencias estadísticamente significativas (Fig. 37-B). Estas diferencias indican que existe un efecto del acetato de leuprolida sobre la frecuencia de consumo de oxígeno al menos para el grupo AL ya que a pesar de que los grupos OVX y OVX+AL tuvieron una frecuencia ligeramente mayor de consumo de oxígeno respecto a los grupos íntegros no se podría asegurar que este fenómeno haya sido producido por el análogo o bien por la ovariectomía (Fig. 37-C).

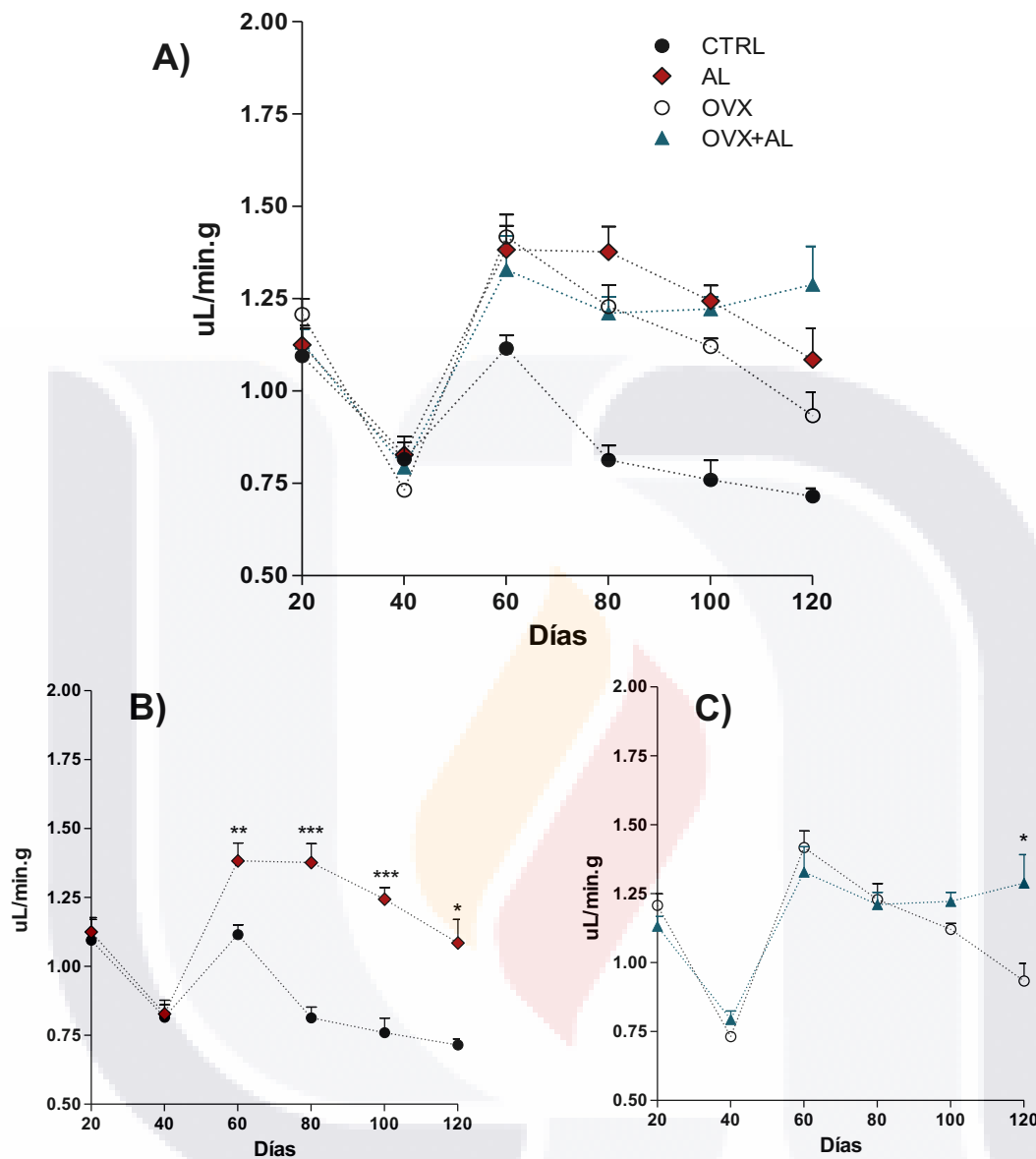


Figura 37. Frecuencia de consumo de oxígeno. Los grupos OVX, OVX+AL y AL resultaron con una mayor tasa de incorporación de oxígeno respecto al grupo control (ANOVA 2V-BONFERRONI, *** $p > 0.001$, ** $p > 0.01$, * $p < 0.05$).

A los 120 días del experimento la frecuencia de consumo de oxígeno entre grupos equivalentes CTRL y AL resultó con diferencias estadísticamente significativas (CTRL, $0.71 \pm 0.02 \mu\text{L/min.g}$ vs AL $1.08 \pm 0.08 \mu\text{L/min.g}$; $p < 0.05$). Por otra parte el grupo OVX+AL terminó con una mayor frecuencia de consumo de oxígeno respecto al grupo OVX (OVX+AL, $1.28 \pm 0.10 \mu\text{L/min.g}$ vs OVX $0.93 \pm 0.06 \mu\text{L/min.g}$; $p < 0.05$). Estos resultados se pueden contrastar con los que se obtuvieron al día 20 en donde se puede observar que los cuatro grupos tienen valores iniciales prácticamente iguales (Fig. 38).

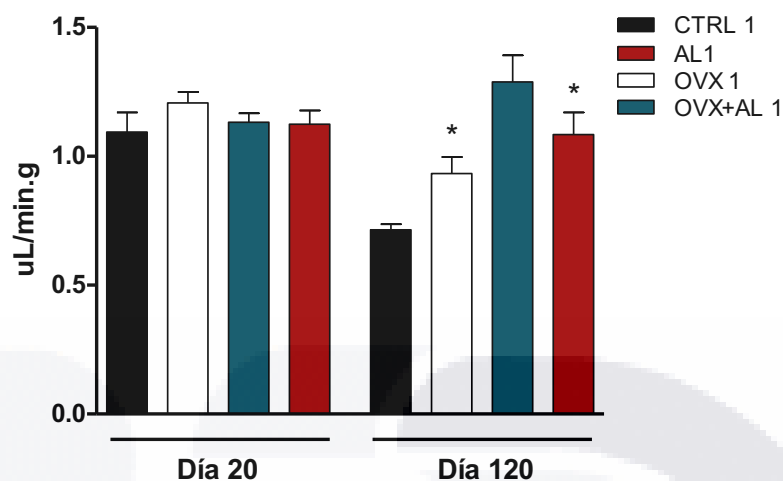


Figura 38. Frecuencia de consumo de oxígeno para todos los grupos al inicio y el final del experimento. Las diferencias estadísticamente significativas se muestran entre grupos equivalentes en un mismo día (CTRL vs AL y OVX vs OVX+AL). (ANOVA 2V, * $p < 0.05$).

5.7.2 Frecuencia de producción de bióxido de carbono

La cantidad de CO_2 producido en función del tiempo para todos los grupos en general fue disminuyendo gradualmente, sin embargo, tanto al inicio como al final no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos equivalentes, permaneció constante con mínimas variaciones (Fig. 39).

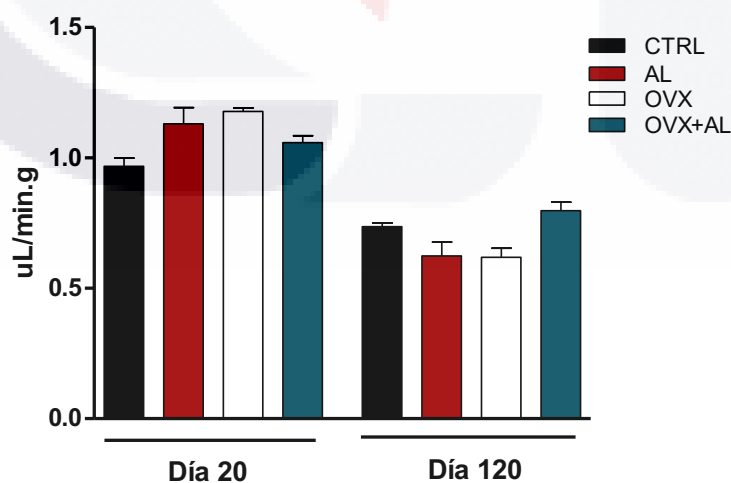


Figura 39. Frecuencia de producción de CO_2 para todos los grupos al inicio y el final del experimento. Las diferencias estadísticamente significativas se muestran entre grupos equivalentes en un mismo día (CTRL vs AL y OVX vs OVX+AL). (ANOVA 2V, * $p < 0.05$)

Los contrastes entre grupos equivalentes para esta variable fueron mínimos y en cada periodo de evaluación se puede apreciar esta constante (Fig. 40 A, B).

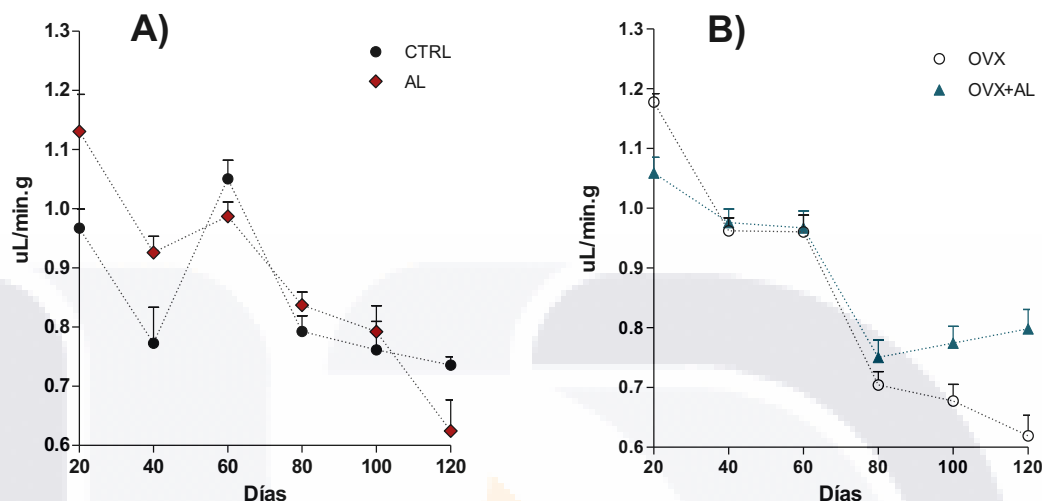


Figura 40. A) Análisis de frecuencia de producción de CO₂ entre el grupo CTRL y AL por cada periodo de evaluación. B) Análisis de frecuencia de producción de CO₂ entre los grupos OVX y OVX+AL. Cada punto en las figuras representa la media y su error estándar (ANOVA 2V-BONFERRONI).

5.7.3 Coeficiente de intercambio respiratorio

Los resultados de coeficiente de intercambio respiratorio (R) como se observan en la figura 41, fueron similares para los grupos AL, OVX y OVX+AL en comparación con los del grupo CTRL el cual desde el día 20 al 120 prácticamente tuvo un R cercano a 1. El resto de los grupos tuvieron un inesperado aumento en el día 40 (R de 1.1-1.3) y para las siguientes determinaciones R se encontró alrededor de los 0.65 unidades (Fig. 41).

Los análisis entre grupos equivalentes indican que los grupos CTRL y AL resultaron con diferencias estadísticamente significativas pero sólo en el periodo que comprende de los 40 -120 días (Fig. 41-B), mientras que los grupos OVX y OVX+AL compartieron gran similitud en los valores de R en todo el experimento (Fig. 41-C). Los resultados para los grupos AL, OVX y OVX+AL en función de su R indican que producían mayor cantidad de CO₂ respecto al oxígeno que consumían. El grupo CTRL con valores de R cercanos a 1 estuvo más cerca de un equilibrio de intercambio gaseoso, lo cual significa un adecuado balance energético.

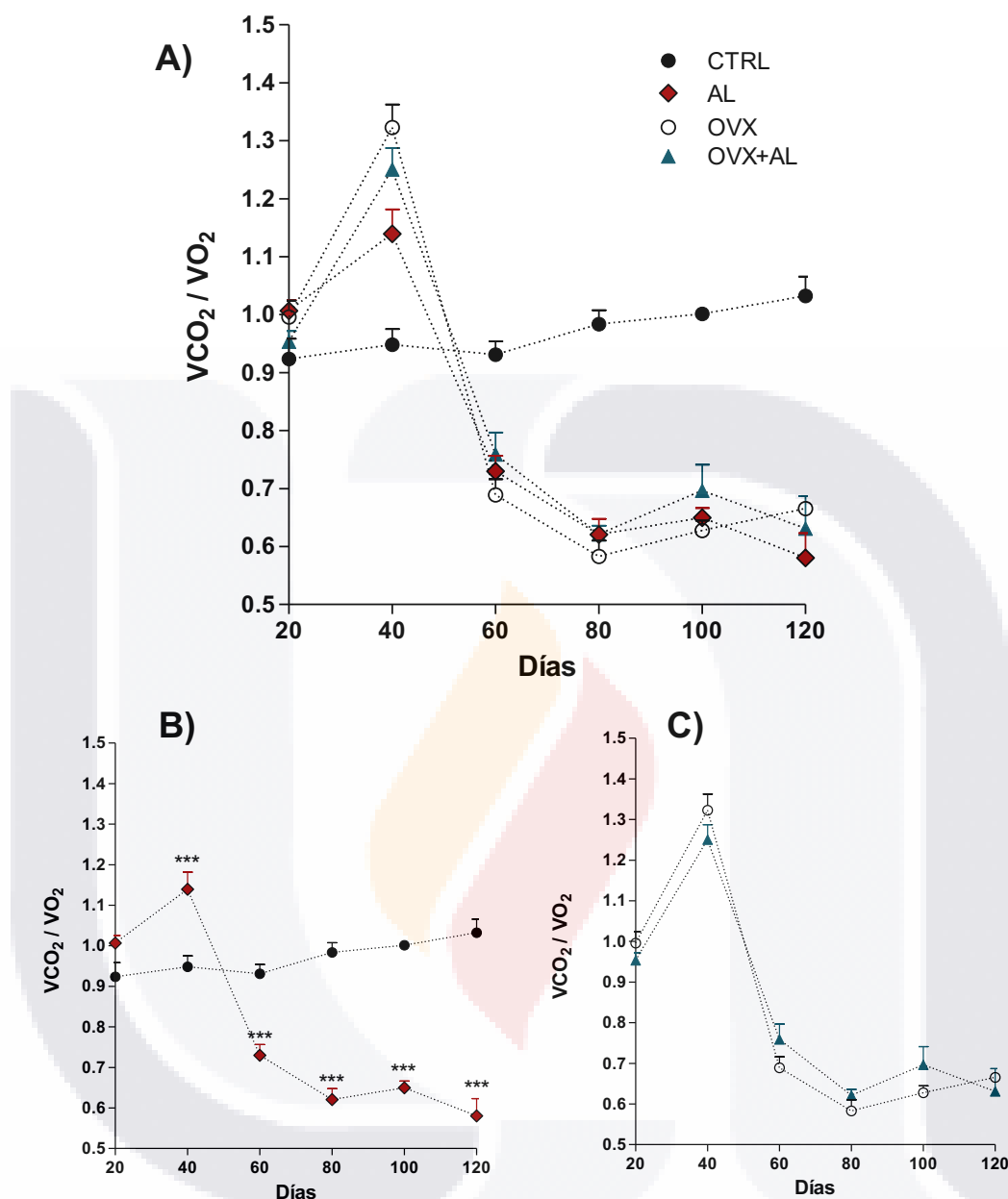


Figura 41. A) Coeficiente de intercambio respiratorio de todos los grupos. B) Análisis comparativo de R entre el grupo CTRL y AL. C) Análisis comparativo de R para los grupos OVX y OVX+AL. Cada punto en las figuras representa la media y su error estándar (ANOVA 2V-BONFERRONI, *** $p > 0.001$, ** $p > 0.01$, * $p < 0.05$).

En el lapso del día 40 a 80 días los valores de R para los grupos OVX, OVX+AL y AL presentaron un descenso respecto al grupo control. Los valores cercanos a 0.7 respecto al coeficiente respiratorio representan que el principal aporte de energía se está dando a partir de los lípidos, lo cual resulta contradictorio ya que estos grupos son los que presentan un mayor incremento en la ganancia de peso corporal. Finalmente cuando se comparó la

diferencia al día 120 entre grupos equivalentes, sólo el grupo CTRL finalizó con un R mayor que el grupo AL.

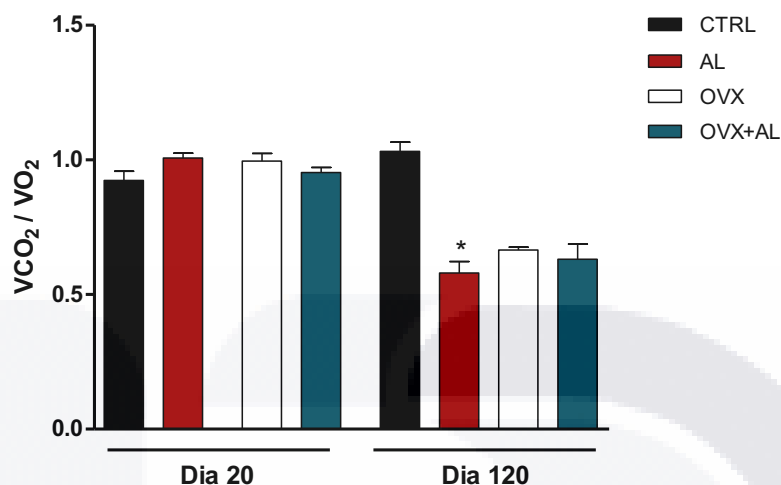


Figura 42. Coeficiente de intercambio respiratorio para todos los grupos al inicio y al final del experimento. Las diferencias estadísticamente significativas se muestran entre grupos equivalentes en un mismo día (CTRL vs AL y OVX vs OVX+AL), (ANOVA 2V, * $p < 0.05$).

5.8 Ensayos bioquímicos

5.8.1 Determinación de glucosa

La concentración de glucosa fue ligeramente superior para los grupos AL, OVX y OVX+AL en comparación de grupo control pero casi la totalidad de las determinaciones resultaron estar dentro del rango aceptable como normal para la rata Wistar (Fig. 43 A, B).

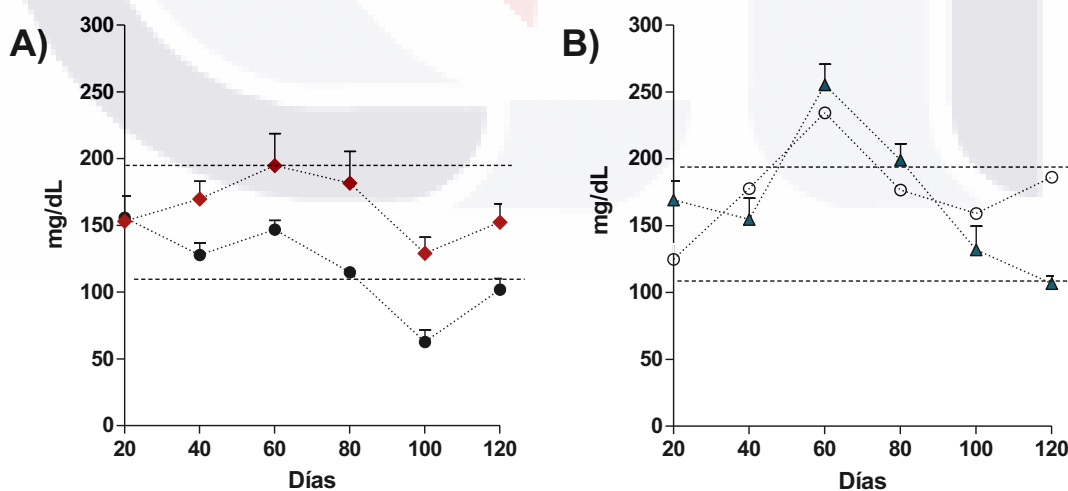


Figura 43. A) Concentración de glucosa en sangre (mg/dL) para los grupos CTRL y AL. B) Concentración de glucosa de los grupos OVX y OVX+AL. La línea discontinua representa, el rango normal de glucemia en rata Wistar. Los ensayos se realizaron por triplicado en una $n = 4$ por cada grupo (ANOVA 2V-BONFERRONI).

Aunque es poco perceptible pero posiblemente el tratamiento y/o la ovariectomía parece aumentar ligeramente las concentraciones de glucosa en sangre, sin embargo, esto no significa un factor de riesgo.

5.8.2 Determinación de triglicéridos

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la concentración de triglicéridos en sangre durante todo el experimento. Los resultados fueron similares en prácticamente todo el experimento y ningún valor estuvo por encima del límite considerado como saludable para la concentración de triglicéridos en rata (Fig. 44).

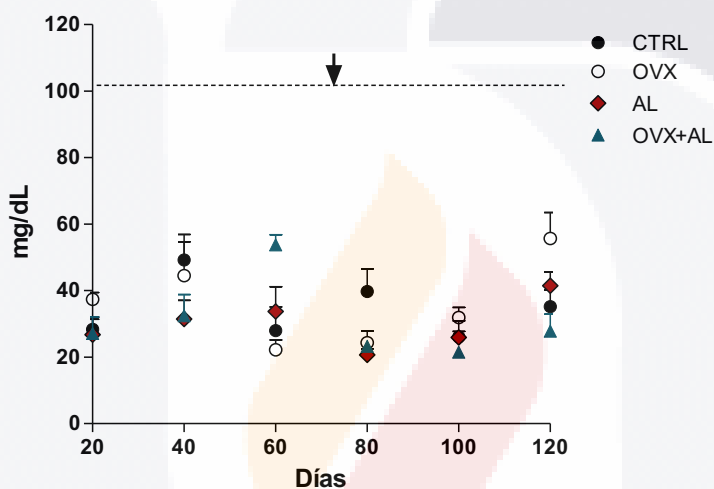


Figura 44. Concentración de triglicéridos en sangre (mg/dL) en todos los grupos experimentales. Cada punto representa la media y su error estándar. Los ensayos se realizaron por triplicado en una n= 4 por cada grupo. (ANOVA 2V-BONFERRONI).

5.8.3 Determinación de colesterol total y HDL

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la concentración de colesterol en sangre durante todo el experimento. Los resultados indican que en cada periodo de evaluación los valores que se obtenían eran similares para todos los grupos y en prácticamente todo el experimento estos valores resultaron dentro del rango permisible de colesterol total en la rata Wistar como se observa marcado con las líneas discontinuas en la figura 45-A. Al igual que con los otros indicadores bioquímicos las concentraciones de colesterol HDL no presentaron cambios o variaciones entre grupos y permanecieron constantes durante todo el experimento. La mayor parte de los valores obtenidos se encontraron por encima del límite inferior saludable para una rata (Fig. 45-B)

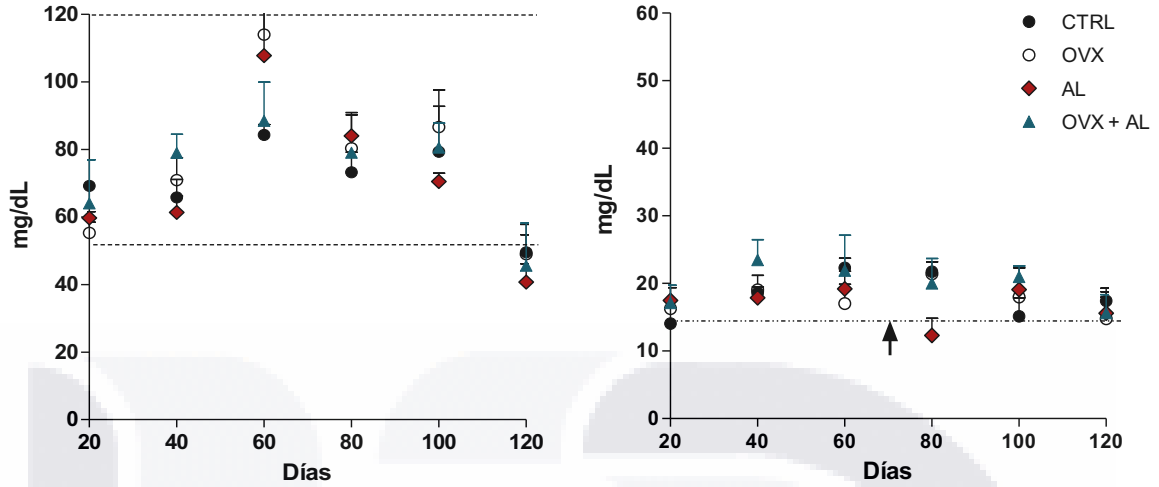


Figura 45. A) Concentración de colesterol total en sangre (mg/dL) y B) Concentración de colesterol HDL en sangre (mg/dL) en todos los grupos experimentales. Cada punto representa la media y su error estándar. Los ensayos se realizaron por triplicado en una n= 4 por cada grupo. (ANOVA 2V-BONFERRONI).

5.9 Consumo de alimento

Los resultados de consumo de alimento se reportan en g/día*100 g de peso del animal. Al finalizar el experimento el grupo AL registro un 9.37 % de consumo de alimento mayor que el grupo CTRL. El mismo análisis indicó que el grupo OVX tuvo un 1.68 % más de consumo de alimento comparado con el grupo OVX+AL.

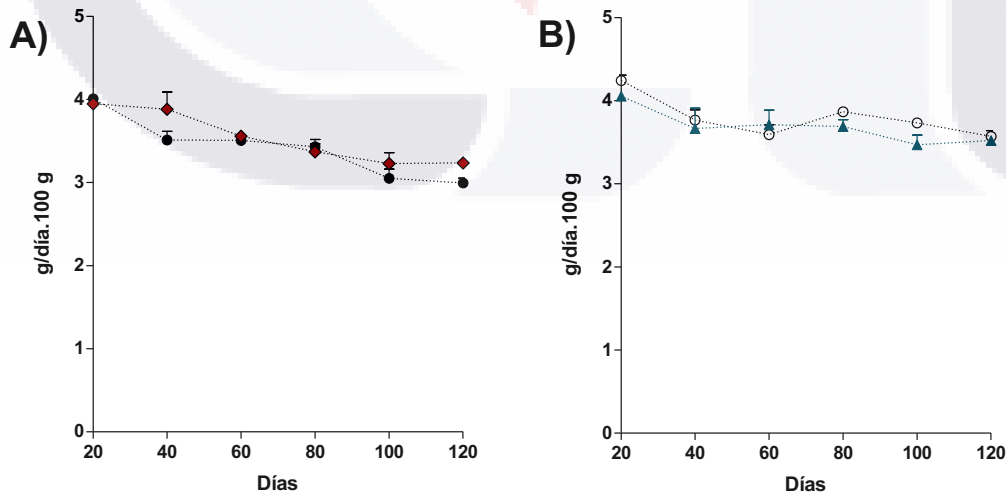


Figura 46. A) Análisis de consumo de alimento para los grupos CTRL y AL; B) Análisis de consumo de alimento para los grupos OVX y OVX+AL. Cada punto en las gráficas representa el promedio acumulado cada 20 días de mediciones diarias del alimento consumido (ANOVA 2V-BONFERRONI)

Cuando el análisis se realizó en función del tiempo se observó que las diferencias entre grupos equivalentes resultaron mínimas en los diferentes periodos de evaluación (Fig. 46), sin embargo, por un largo periodo esas mínimas diferencias resultan en una mayor ingesta acumulada y por ende mayor posibilidad de ganancia de peso. Para poder saber si la ingesta de alimento tenía un impacto directo sobre el desarrollo de peso corporal, se realizó un análisis de regresión con los promedios de consumo de alimento por cada grupo y periodo de evaluación y se comparó con los pesos promedio en el mismo orden. Los resultados de este análisis indicaron que el peso del animal es proporcional al consumo de alimento (Fig. 47).

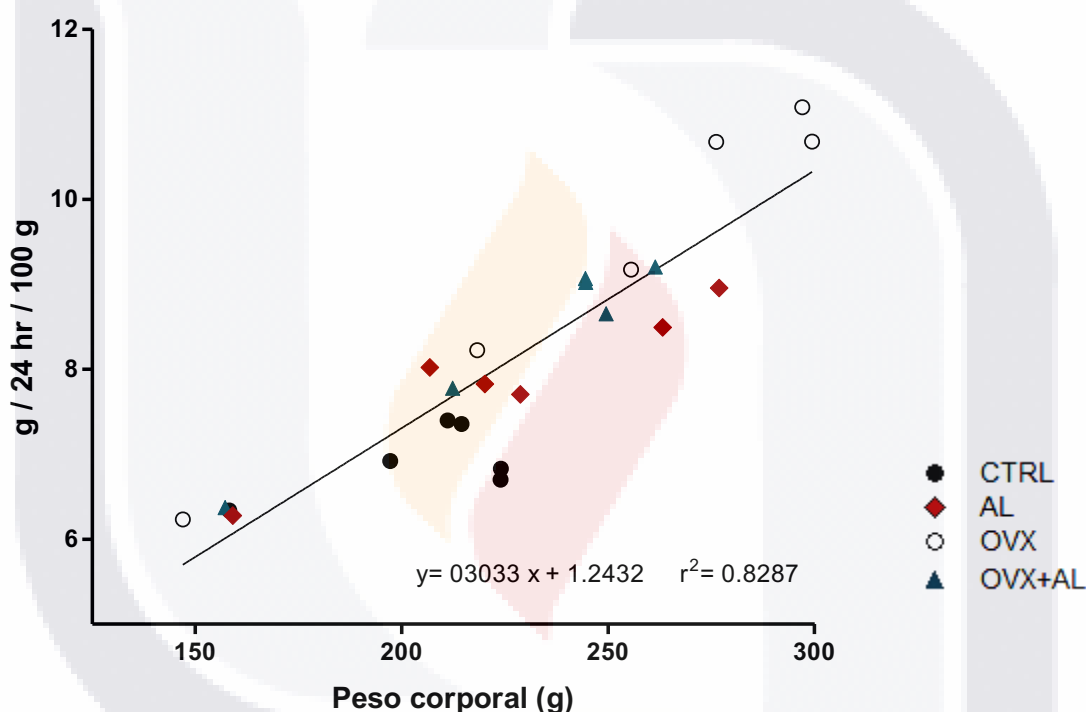


Figura 47. Análisis de regresión entre el peso corporal y el consumo de alimento de todos los grupos por los 6 periodos de evaluación. Cada punto representa la comparación de la medias entre ambas variables.

5.10 Consumo de agua

A partir del día 40 tanto grupos íntegros como ovariectomizados resultaron tener diferencias considerables entre sí, hasta el final del experimento. El grupo AL tuvo un 3.1 % más de consumo de agua respecto al CTRL en el día 120 mientras que el grupo OVX+AL al final resultó con un 7.2 % mayor que el grupo OVX (Fig. 48-A). Aunque no se presentaron diferencias estadísticamente significativas, se observó que los grupos ovariectomizados tuvieron un consumo menor al final del experimento respecto a los grupos íntegros, pero

además esta diferencia se observó prácticamente a partir del día 60 del experimento (Fig. 48-A,B).

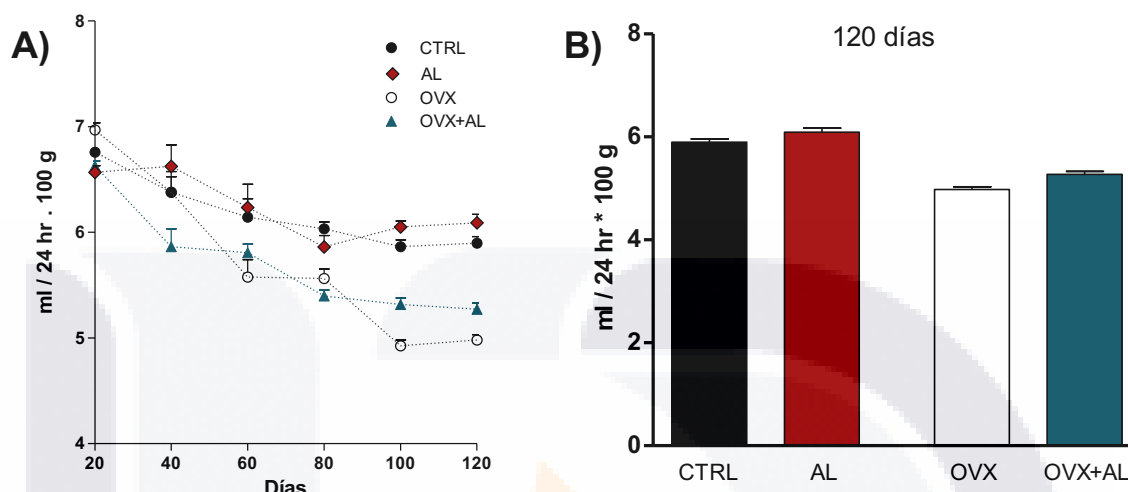


Figura 48. A) Consumo de agua para todos los grupos experimentales durante todo el proyecto. B) Histograma de consumo de agua a los 120 días para todos los grupos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas pero si un historial de consumo igual tanto para grupos íntegros como ovariectomizado

5.11 Análisis de RT-PCR

Los resultados de expresión de RNAm se expresaron como la proporción de la señal emitida de las bandas de los productos de amplificación deseados, normalizados con la señal de GAPDH. Los análisis se realizaron de muestras obtenidas a los 20 y 120 días, lapso considerado como el inicio y final del experimento respectivamente.

5.10.1 Expresión de RNAm de Ghrelina

Como se puede observar en la figura 49 al final del experimento, la expresión del RNAm de grelina incrementó en cerca de un 70 % para el grupo AL comparado con el grupo CTRL ($p < 0.05$), mientras que el grupo OVX+AL resultó con un 27 % menos de expresión de RNAm de grelina en comparación con el grupo OVX ($p < 0.05$). De hecho, el grupo OVX tuvo los valores más altos de expresión de RNAm de grelina que el resto de los grupos de estudio (Fig. 49). A pesar de que la expresión de RNAm de grelina del grupo AL en el día 20 fue mayor que el grupo CTRL, la expresión a los 120 días incrementó considerablemente pero no así para el grupo CTRL.

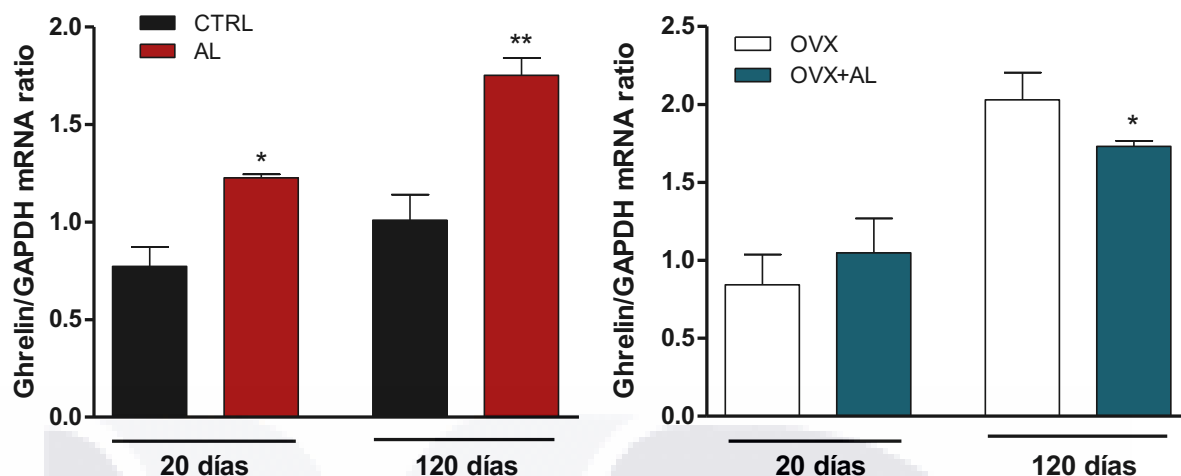


Figura 49. Expresión del RNAm de grelina a los 20 y 120 días para todos los grupos experimentales. Se comparan grupos equivalentes íntegros y ovariectomizados (inicio vs final). (ANOVA-2V, *p < 0.05).

Los cambios en expresión de grelina también se notaron en función del tiempo, el grupo AL tuvo una mayor expresión del RNAm de grelina en el día 120 en comparación que la que obtuvo el día 20. El grupo CTRL fue el único que no presentó cambios en este sentido. Los grupos OVX y OVX+AL de igual forma resultaron con aumentos importantes en la expresión del RNAm de grelina al día 120 en comparación con el día 20. En la figura 50 se observa una imagen representativa de los ensayos realizados de productos de PCR para el RNAm de grelina (347 pb) y GAPDH (207 pb), los cuales, posteriormente se analizaron y cuantificaron.

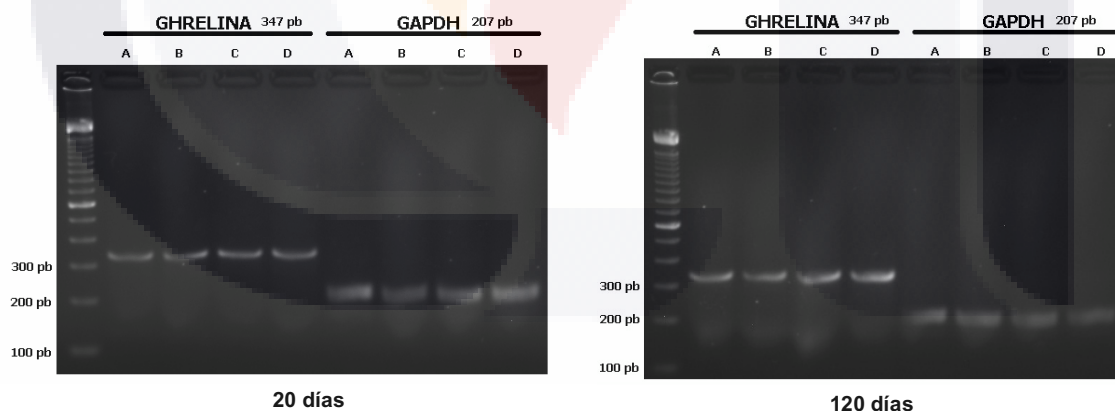


Figura 50. Fotografía representativa de los productos de amplificación del RNAm de grelina (347pb) y GAPDH (207 pb) de todos los grupos experimentales a los 20 y 120 días. Pozo A-CTRL, pozo B-OVX, pozo C-OVX+AL y pozo D-AL.

5.10.2 Expresión de RNAm de Leptina

La expresión del RNAm de leptina no tuvo cambios considerables en su expresión, únicamente el grupo OVX+AL al final del experimento aumento un 8 % su expresión

respecto a su grupo equivalente OVX ($p < 0.05$). El grupo AL a pesar de que desde el inicio del experimento resultó con una menor expresión del RNAm comparado con el grupo control, a los 120 días ambos grupos tuvieron una expresión de leptina muy similar (Fig. 51).

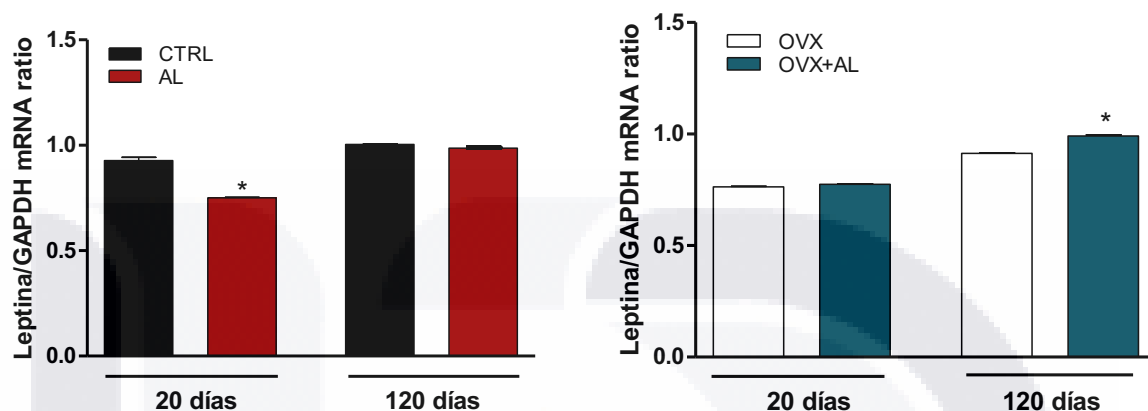


Figura 51. Expresión del RNAm de leptina a los 20 y 120 días para todos los grupos experimentales. Se comparan grupos equivalentes íntegros y ovariectomizados. (ANOVA-2V, $*p < 0.05$).

En relación al análisis de expresión del RNAm de leptina inicial y final por cada grupo, se observó que para el caso del grupo CTRL no hubo cambios y permaneció prácticamente igual, respecto al grupo AL a pesar de que en un inicio tuvo menor expresión de RNAm de leptina comparado con el grupo CTRL, este, finalizó con 23 % mas de expresión (Fig. 51).

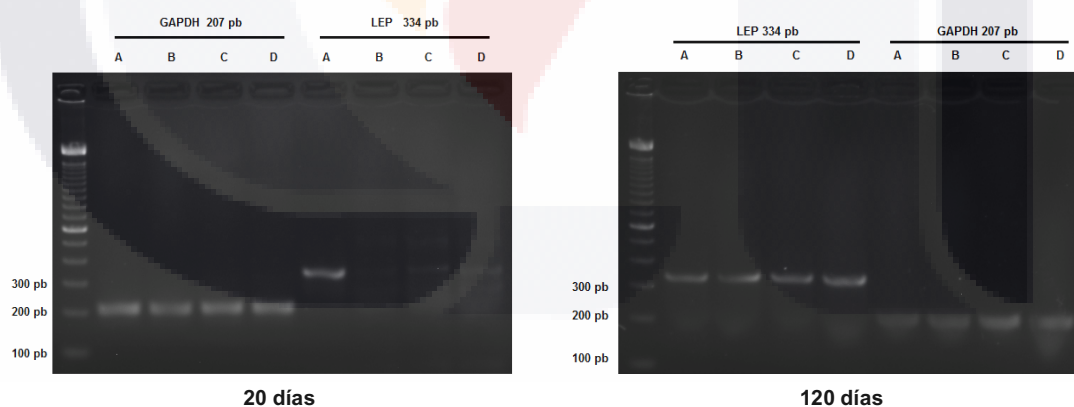


Figura 52. Fotografía representativa de los productos de amplificación del RNAm de leptina (334 pb) y GAPDH (207 pb) de todos los grupos experimentales a los 20 y 120 días. Pozo A-CTRL, pozo B-OVX, pozo C-OVX+AL y pozo D-AL.

Para los grupos OVX y OVX+AL se presentaron incrementos de expresión de leptina de 15 y 22 % respectivamente. La figura 52 es una fotografía representativa de los ensayos de leptina con los productos de amplificación del RNAm de leptina y GAPDH.

5.10.3 Expresión de mRNA de Lipoproteínlipasa

Los resultados de expresión del RNAm de LPL indicaron que el grupo AL finalizó con una mayor expresión de LPL de 40 % por encima del grupo CTRL ($p < 0.05$), el cual, resultó con igual expresión que al inicio del experimento. Interesantemente cuando se realizó el mismo análisis en los grupos ovariectomizados, el grupo OVX resultó con una mayor expresión de LPL con un 55 % más que el grupo OVX+AL ($p < 0.05$), (Fig. 53).

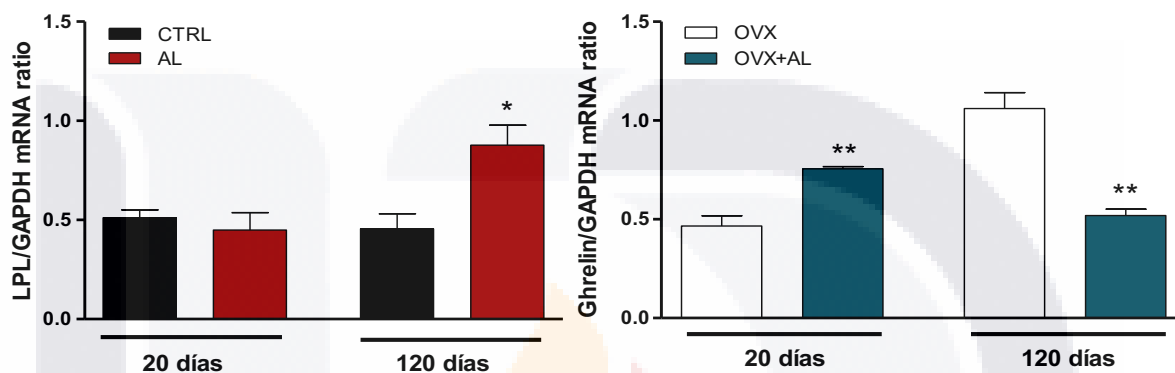


Figura 53. Expresión del RNAm de LPL a los 20 y 120 días para todos los grupos experimentales. Se comparan grupos equivalentes íntegros y ovariectomizados. (ANOVA-2V, * $p < 0.05$).

Cuando el análisis se realizó en función al tiempo y un mismo grupo, se pudo observar que a diferencia del grupo CTRL, el resto de los grupos de estudio, tuvieron cambios notables, como es el caso del grupo AL el cual, tuvo un aumento de expresión del RNAm de LPL de 44 % al día 120, comparado con el día 20.

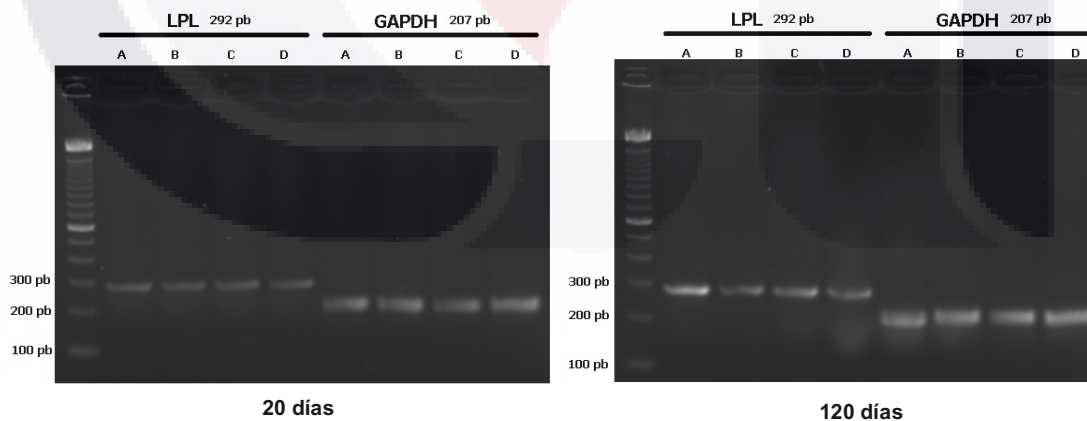


Figura 54. Fotografía representativa de los productos de amplificación del RNAm de LPL (292 pb) y GAPDH (207 pb) de todos los grupos experimentales a los 20 y 120 días. Pozo A-CTRL, pozo B-OVX, pozo C-OVX+AL y pozo D-AL.

El grupo OVX bajo el mismo análisis aumentó un 54 % y el grupo OVX+AL disminuyó un 24% respecto a la expresión de RNAm de LPL obtenida al día 20 (Fig. 53). En la figura

54 se muestra una fotografía de los productos de amplificación de LPL (292 pb) y GAPDH (207 pb) obtenidos a los 20 y 120 días.



6. Discusión

En la actualidad el uso de análogos de GnRH está ampliamente distribuido debido a su papel central de regular directamente procesos de tipo reproductivo. Las aplicaciones más reconocidas a nivel clínico de la GnRH y sus análogos, son la estimulación o supresión gonadal permitiendo incrementar o reducir la fertilidad en mamíferos, regulación hormonal en casos de pubertad precoz o tardía, tratamientos oncológicos en hombres y mujeres como: hiperplasia prostática, endometriosis, ovarios poliquísticos, fibromas uterinos, cáncer de ovario, etc. (Millar & Newton, 2013). Este papel le ha dado años de investigación no solo en profundizar y conocer sus mecanismos de acción, sino en desarrollar análogos con igual o mayor efecto terapéutico debido a las manipulaciones en la molécula original, se sabe que la substitución de aminoácidos por isómeros D, aumenta la afinidad al receptor potenciando su efecto de 10 (D-Leu, Leuprorelina) a 100 (D- triptófano, Triptorelina) veces más respecto a la GnRH endógena. Las modificaciones en la parte final de la molécula le confieren resistencia a proteólisis y por ende mayor tiempo de vida en circulación (Karten & Rivier, 1986). Esto se traduce en mejores efectos biológicos y respuestas terapéuticas, sin embargo, esto también podría causar efectos indeseados, uno de los frecuentemente reportados es la ganancia subsecuente de peso, sin embargo, existen escasos estudios dirigidos a entender este fenómeno.

El empleo del acetato de leuprolida como agente terapéutico en problemas del sistema reproductivo y oncológicos es considerado como uno de los más seguros y de fácil disponibilidad (Wilson, Meethal, Bowen, & Atwood, 2007). Además, gracias al papel neurotrófico que le ha sido conferido a la GnRH, en los últimos años esta hormona y sus análogos han sido probados en procedimientos experimentales relacionados con problemas del sistema nervioso, Guzman-Soto y colaboradores en 2012 encontraron que un tratamiento con acetato de leuprolida mejora los signos clínicos de locomoción en ratas con encefalopatía autoinmune experimental, incrementando marcadores como proteína básica de mielina, neurofilamentos y con una ganancia considerable de peso corporal. Tanto a nivel clínico como experimental este efecto secundario sólo se ha reportado como un dato adicional y con muy poca atención en describir si el cambio de peso genera cambios en algún componente de la composición corporal, como lo son MG y MLG.

Este estudio demostró que el tratamiento a largo plazo con acetato de leuprolida es capaz de generar cambios en la composición corporal tanto en animales íntegros como ovariectomizados además de que produce cambios importantes en indicadores

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

murinométricos, metabólicos y marcadores orexigénicos. Referente al peso corporal se confirmó que el tratamiento, genera aumento incrementos a largo plazo en un animal íntegro (AL) esto concuerda con observaciones hechas en tratamientos de pubertad precoz (Aguiar et al., 2006; Anik et al., 2015; Chiumello et al., 2000), cáncer prostático (Basaria et al., 2002; Smith, 2004b) y regulación de fertilidad (Herbert & Trigg, 2005; Lessey, 2000). Esto indicó un efecto directo sobre el peso corporal de animales íntegros y sin ninguna patología asociada como en los reportes anteriormente mencionados. Cabe señalar que los animales ovariectomizados sin tratamiento (OVX), terminaron con el mayor aumento de peso en comparación con el resto de los demás grupos (CTRL, AL y OVX+AL), esto también confirma que la remoción gonadal y por ende la pérdida de secreción esteroidea, es suficiente para inducir cambios en el peso corporal como ya ampliamente se ha difundido, esto sucede en la mayoría de los mamíferos (Moorman et al., 2009; Wegorzewska et al., 2008; Wei et al., 2014). Nguyen et al 2004, en un modelo de ovariectomía en gatos reportó un incremento de 53 % de aumento de peso después de 60 días después de la cirugía en comparación con un grupo sham con solo el 27 %. En una buena parte de los trabajos que estudian los efectos de la gonadectomía el reemplazo de hormonas esteroidales parece controlar estos aumentos de peso corporal. Sin embargo, parece ser que el acetato de leuprolida tuvo un efecto similar cuando se aplicó en animales castrados (OVX+AL) ya que no incrementaron su ganancia en peso de la misma forma que lo hizo el grupo OVX. Este hallazgo posiblemente conduzca al planteamiento de nuevos experimentos para conocer si el acetato de leuprolida juega un papel en la prevención de aumento de peso y como ocurre en animales con ausencia de gónadas. Además, prácticamente es nulo encontrar esta asociación en otros estudios, se puede hipotetizar quizás, que existe algún otro tejido blanco que esté supliendo la función secretora de la gónadas.

Es importante señalar que los animales utilizados en este experimento, se encontraban en una edad todavía de crecimiento y tal situación fue aprovechada para saber si el acetato de leuprolida afectaría esta condición. Al igual que sucedió con el peso, la longitud de los grupos experimentales se modificó en respuesta a los tratamientos, tal y como se observó con el grupo AL que prácticamente de la mitad del experimento hasta el final los animales tuvieron registros de mayor longitud naso-anal en comparación que el grupo CTRL. El aumento de estatura después de un tratamiento con análogos a GnRH se ha reportado desde casos de pacientes con insensibilidad a hormona de crecimiento (El Kholly & Elsedfy, 2011) hasta en adolescentes que llegan a la pubertad con una estatura

baja (Tanaka et al., 1997). En animales experimentales tratados por largos periodos con triptorelina un análogo de GnRH se observó un incremento final en la longitud con cambios en la secreción de hormona del crecimiento (Gevers, Wit, & Robinson, 1998).

Hasta este punto sólo se había confirmado que el acetato de leuprolida tenía un efecto sobre el peso final y la longitud de los animales, sin embargo, en nuestro estudio el consumo de alimento guardaba una relación importante con los grupos experimentales que presentaban incrementos importantes en peso. Al parecer los animales más pesados como los del grupo OVX también tuvieron un consumo de alimento alto en todo el experimento, esto se pudo verificar con el indicador de ganancia específica de peso (GEP) que también fue alto para este grupo. El aumento en el consumo de alimento o hiperfagia se ha asociado como una de las principales causas de ganancia de peso en modelos experimentales que fueron sometidos a ovariectomía como es el caso del estudio de Jiang et al., 2008 que reportó que la hiperfagia era la causa principal de ganancia de peso en ratas Sprague-Dawley y recientemente en un nuevo estudio se reportó que si se previene esta sobrealimentación en ratas ovariectomizadas, se puede incidir sobre la ganancia de peso corporal y los depósitos de lípidos a nivel hepático (Kitson et al., 2015).

La mayoría de los estudios que reportan estas respuestas derivadas de los tratamientos con GnRH o sus análogos sólo se limitan a dar a conocer peso, talla o longitud según sea el caso y en escasas ocasiones miden los componentes de composición corporal. En este experimento la determinación de los componentes de la composición corporal fue el principal eje de estudio. Se buscó la forma de poder evaluar a través del tiempo estos componentes mediante técnicas no invasivas y de alta reproducibilidad, para esto se montó la determinación de la composición corporal mediante hidrodensitometría y ecuaciones predictivas de MG y MLG. Bajo estos análisis se observó que el grupo AL tuvo valores de MG mayores en comparación con el grupo CTRL, en cuanto al componente de MLG este no tuvo diferencias considerables. En ensayos clínicos de terapias dirigidas a tratamiento de cáncer de próstata con acetato de leuprolida para causar disminución de andrógenos, se ha reportado que hay incrementos de peso corporal y además aumentos en MG, esto ha sido determinado por diferentes técnicas como bioimpedancia eléctrica y absorciometría fotónica dual de rayos x (Smith, 2004a; Stoch et al., 2001). Al igual que ocurrió con el peso corporal, el grupo OVX obtuvo los valores de MG más altos en comparación con los demás grupos de estudio y nuevamente se observó una relación del efecto del acetato de leuprolida sobre este componente de MG en el grupo OVX+AL, ya

que a partir del día 60 hasta el final del experimento no cambió y sólo tuvo mínimas variaciones. De modo que con este análisis se pudieron observar dos respuestas, primero el efecto que tiene el acetato de leuprolida sobre el aumento de MG en el grupo AL (íntegro) y segundo el papel que el acetato de leuprolida ejerce sobre la modulación del aumento de MG en función del tiempo en el grupo OVX+AL (ovariectomizado).

Se sabe desde hace tiempo que los tratamientos a largo plazo con análogos de GnRH pueden causar una desensibilización de los gonadotropos hipofisarios, lo que conduce a una parcial o total falta de respuesta de FSH o LH en sujetos eugonadales (Meldrum et al., 1982). Esta condición limita la producción de esteroides evitando una retroalimentación negativa a nivel hipotalámico e hipofisario en la secreción de GnRH (Ohtsuka et al., 1989). De tal forma que esta ausencia de esteroides puede ser de origen quirúrgico o bien farmacológico y esto generar una respuesta similar para ambos casos tanto en ganancia de peso, incremento en la ingesta y por ende modificaciones en composición corporal. Shimizu et al., en 1996 demostró que los niveles reducidos de estradiol (E_2) en circulación derivado de una ovariectomía bilateral total, incrementa la expresión del RNAm de neuropeptido Y (NPY) a nivel hipofisario, un péptido de tipo orexigénico. Se reportado que no solo los niveles bajos de E_2 ocasionan un aumento en la secreción de NPY sino también una disminución en la sensibilidad a la leptina, una hormona implicada en procesos de saciedad. Estas observaciones podrían asociarse a la ganancia de peso que registró el grupo AL en el experimento, que posiblemente pudo tener una respuesta similar a lo explicado anteriormente. Actualmente se ha demostrado que la terapia de reemplazo de estrógenos, ayuda a prevenir el incremento en peso corporal tanto en procedimientos clínicos como experimentales (Ainslie et al., 2001; Litwak et al., 2014).

Para asegurar que las determinaciones de composición corporal fueran las adecuadas se realizó el cálculo de MG y MLG mediante un segundo método el cual se valía de mediciones murinométricas. Se esperaba que con este tipo de cálculo pudiera existir mayor variabilidad de los datos obtenidos, sin embargo, no fue así ya que se pudo constatar que los datos obtenidos guardaban una relación muy estrecha con los calculados mediante hidrodensitometría. Prácticamente confirmaron los hallazgos de composición corporal del primer método utilizado sin embargo, ambos métodos servían para determinar la composición corporal *in vivo*, por tal motivo en cada periodo de evaluación se decidió tomar una muestra representativa de cada grupo y hacer un análisis de composición corporal más exacto mediante un estudio de disección. Interesantemente en este ensayo se confirmó

que el grupo AL presentó valores más altos de MG (peso de la piel) y MLG (carcasa) respecto al grupo CTRL. Los grupos ovariectomizados resultaron con similar MG y la MLG sólo fue diferente a partir del día 80 al 120, con valores mayores para el grupo OVX. Se realizó una consulta bibliográfica acerca de los cambios en composición corporal producidos por el uso de análogos de GnRH y de los escasos reportes encontrados se puede constatar que los análogos de GnRH son capaces de generar cambios en composición corporal, sin embargo, estos estudios fueron realizados en condiciones fisiopatológicas y sin control dietético alguno, aun así buena parte de estos estudios indican que los principales cambios producidos después de una terapia con agonistas a GnRH son en MG y con ligeros cambios en MLG (Boxer et al., 2005; Park et al., 2012; Smith, 2004b; Yamasaki et al., 2001).

Adicionalmente se realizó la extracción de lípidos totales en piel con el propósito de saber si el tratamiento generaba deposiciones de MG. Se pudo confirmar que los animales que presentaron mayor peso en piel y extracto lipídico correspondían a aquellos que presentaron un índice ponderal. Esto indica que el índice ponderal además de significar que tan grande es un animal en función al resultado del mismo, bien podría asociarse a la cantidad de masa grasa subcutánea, algo que no está asociado aun en el acervo científico.

Una vez realizados los estudios de composición corporal y confirmar la similitud de los datos obtenidos por las dos metodologías *In vivo* y de análisis directo (disección), se elaboró un estudio de correlación para verificar con pruebas estadísticas que realmente los métodos de estudio de composición corporal arrojaron resultados confiables, para esto se relacionaron variables de MG y MLG obtenidas con los métodos *In vivo* con aquellas obtenidas por disección. El análisis fue satisfactorio y se comprobó que las técnicas de análisis de composición corporal tuvieron una similitud muy alta no sólo entre los métodos *In vivo* sino también con el método de disección. En estudios de antropometría se asume que cuando se realizan análisis de composición corporal por el método que sea, es necesario validar los resultados con un segundo estudio ya sea diferente del primero o bien el mismo estudio pero realizado por otra persona (S. B. Heymsfield et al., 1990; LaForgia, Gunn, & Withers, 2008). En este sentido, el experimento se logró verificar los resultados por 3 diferentes vías.

Para tratar de dilucidar el mecanismo por el cual se producen los cambios en la composición corporal realizaron estudios de tipo metabólico en los cuales básicamente se pretendía conocer la tasa metabólica de los diferentes grupos experimentales. Se encontró

que los grupos AL, OVX y OVX+AL tuvieron consumos de O₂ muy similares entre sí y con valores mayores 1.1 uL/min*g, esto está directamente relacionado con el tamaño, peso y composición corporal del animal. Esto se debe a que el aumento en el consumo de oxígeno guarda una estrecha relación en función de la ganancia de peso corporal, ya que a mayor incremento de tamaño y peso de igual forma incrementará la demanda de oxígeno (Holliday et al., 1967). Esta observación parece tener relación para los grupos AL, OVX y OVX+AL quienes fueron los que presentaron mayor incremento de peso corporal. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Novelli et al., 2010 quien incluso propone el consumo de oxígeno como un biomarcador de obesidad. Sin embargo, este resultado por sí solo no indica que a pesar de que haya mayor consumo de oxígeno el animal tenga una buena eficiencia energética. Por otra parte la producción de CO₂ resultó ser menor a 0.8 μL/min*g prácticamente en gran parte del estudio para los grupos AL, OVX y OVX+AL. De tal forma que al menos en estos 3 grupos la eficiencia de intercambio respiratorio no fue la más adecuada. En otras palabras, aunque estos animales incorporaron mayores volúmenes de oxígeno, el intercambio de CO₂ no fue equivalente como se esperaría en cualquier organismo en condiciones basales de equilibrio. A nivel metabólico este resultado indica que no hay una correcta asimilación de oxígeno y por ende no hay una eficiencia de oxidación de los nutrientes adecuada. Principalmente la fuente de energía de estos tres grupos experimentales como lo indica su coeficiente respiratorio, provenía de la oxidación de lípidos más que de los propios hidratos de carbono. En cambio el grupo CTRL en todo el experimento mostró valores de intercambio respiratorio cercanos a 1 μL/min*g, esto habla de una eficiencia energética optima ya que prácticamente el oxígeno que incorporaban era casi igual al CO₂ que producían, además que en función a su coeficiente respiratorio se puede afirmar que su principal fuente energética provenía de los carbohidratos.

En un estudio con ratas hembras con aumento de peso y masa grasa a las cuales se les administró hormona del crecimiento y alimentación a libre demanda se le asocio un coeficiente de intercambio respiratorio bajo, algo muy similar a lo que se observó en nuestro estudio (Greenbaum, 1953). Hainer et al., 2000, reportaron que el coeficiente de intercambio respiratorio puede aumentar en pacientes obesos tratados con una dieta muy baja en calorías y que pacientes obesos quienes perdieron peso durante un año el coeficiente respiratorio puede ser bajo. Mientras que un estudio reciente en humanos, se observó lo contrario aquellos sujetos que presentaron mayor peso corporal y masa grasa el coeficiente respiratorio fue alto (Shook et al., 2016).

Debido a la naturaleza del estudio, se determinaron las concentraciones de biomoléculas en circulación glucosa, colesterol, triglicéridos y colesterol HDL, esto con la finalidad de observar si el tratamiento con acetato de leuprolida podría generar cambios en la movilización de estos sustratos. Sin embargo, en ninguno de los indicadores antes mencionados se encontraron variaciones en función de los valores que se consideran normales para la rata Wistar. Referente a las determinaciones de glucosa llamó la atención que los grupos AL, OVX y OVX+AL tuvieron los valores más altos de glucosa en comparación con el grupo CTRL, sin embargo, como se mencionó anteriormente estos valores aunque altos, se encontraban dentro de un rango aceptable para la bioquímica sanguínea.

En lo que corresponde a los estudios de RT-PCR se encontró una alta expresión de RNAm de grelina en el grupo AL, mismo grupo que tuvo ganancia en peso e ingesta de alimento comparado con el grupo CTRL. Hasta ahora, las presentaciones comerciales de acetato de leuprolida de uso humano, advierte acerca de la rápida ganancia de peso durante su uso, sin embargo no hay una clara explicación de este fenómeno. En este estudio se encontró que el tratamiento a largo plazo con acetato de leuprolida incrementa la expresión del RNAm de grelina y que esto a su vez, podría asociarse con un alto consumo de alimento y un aumento secundario en la ganancia de peso. De igual forma también se observó que hubo una mayor expresión de RNAm de grelina y LPL en el grupo OVX en un valor incluso por encima del que registró el grupo AL. Este último grupo a su vez terminó con una mayor expresión de LPL por encima del grupo CTRL. Esta condición puede favorecer incrementos en el peso y mayor predisposición a la ganancia de masa grasa debido a una mayor expresión de la LPL. Además, se ha reportado que la administración de grelina puede favorecer un mayor consumo de alimentos y en adición cuando existe una supresión de estrógenos hay una predisposición a desarrollar obesidad y que además estos estrógenos ayudan a regular la transcripción del gen LPL (Homma et al., 2000; Pedersen et al., 1992). La expresión del RNAm de leptina en el grupo CTRL y AL no tuvo cambios al final del experimento, sin embargo, el grupo que presentó una mayor expresión del RNAm de esta hormona fue el OVX+AL en comparación con el grupo OVX, este aumento final de la expresión de leptina podría estar relacionado con la estabilización de ganancia de peso y masa grasa en este grupo. Se ha reportado que la secreción de leptina no siempre se

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

altera en cuanto a sus niveles plasmáticos cuando hay una condición de obesidad, así que posiblemente no se logró ver cambios en esta hormona por esta situación. Quizás un mejor indicador de leptina para este estudio pudo haber sido el receptor a leptina, el cual parece ser el más afectado por estímulos externos.



7. Conclusiones

La administración de acetato de leuprolida a largo plazo promueve la ganancia de peso y longitud, en animales íntegros, mientras que en animales ovariectomizados genera un efecto contrario, regulando la ganancia del mismo. Este hallazgo parece ser que le confiere al acetato de leuprolida un papel no descrito aún y por ende es necesario esclarecer esta función con futuros experimentos.

Tanto en animales íntegros como ovariectomizados el tratamiento con acetato de leuprolida genera cambios en la composición corporal los cuales se reflejaron en sus dos principales componentes MG y MLG, sin embargo, la ovariectomía también produce cambios en la composición corporal principalmente en el componente MG.

El consumo de alimento es mayor para los animales íntegros tratados con acetato de leuprolida y de igual forma para los ovariectomizados tratados con solución salina. Nuevamente cuando el acetato de leuprolida se aplicó por largos periodos en animales ovariectomizados redujeron considerablemente su consumo de alimento. Además hay una asociación muy fuerte entre el peso total de cada animal y su consumo de alimento.

Parece ser que hay una combinación de factores que desencadenan el aumento de peso corporal y por ende los cambios en la composición corporal, por una parte el paulatino aumento de consumo de alimento a lo largo del experimento y por otra la eficiencia metabólica de los grupos experimentales que tuvieron cambios importantes en el coeficiente respiratorio.

El tratamiento con acetato de leuprolida generó cambios en la expresión del RNAm de grelina, que es considerado como un péptido inductor de hambre y esta expresión fue mayor en los grupos tratados con este análogo, tanto íntegro como ovariectomizados. No hubo cambios en la expresión de leptina a excepción del grupo ovariectomizado tratado con acetato de leuprolida que tuvo la mayor expresión del RNAm y esto probablemente fue fundamental para evitar la ganancia de peso. La expresión de LPL fue mayor en los grupos que mayor peso corporal registraron.

El acetato de leuprolida no genera cambios en los sustratos energéticos en circulación.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Este estudio es uno de los primeros que describen un efecto directo del acetato de leuprolida sobre la composición corporal a largo plazo en animales que no sufren eventos fisiopatológicos y además con un control en la dieta. Actualmente el uso del acetato de leuprolida tiene diferentes aplicaciones terapéuticas y es ampliamente utilizado en todo el mundo. El estudio de modelos experimentales de este tipo puede ayudar a proponer los posibles mecanismos por los cuales los análogos de GnRH como el acetato de leuprolida promueven cambios en la composición corporal. Los hallazgos de este estudio pueden ser de utilidad en la prevención de efectos indeseados por tratamientos con análogos de GnRH y tomar las medidas profilácticas.



8. Referencias bibliográficas

1. Aguiar, A. L., Couto-Silva, A. C., Vicente, E. J., Freitas, I. C., Cruz, T., & Adan, L. (2006). Weight evolution in girls treated for idiopathic central precocious puberty with GnRH analogues. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism: JPEM*, 19(11), 1327–1334.
2. Ahima, R. S., Prabakaran, D., Mantzoros, C., Qu, D., Lowell, B., Maratos-Flier, E., & Flier, J. S. (1996). Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*, 382(6588), 250–252. <https://doi.org/10.1038/382250a0>
3. Ainslie, D. A., Morris, M. J., Wittert, G., Turnbull, H., Proietto, J., & Thorburn, A. W. (2001). Estrogen deficiency causes central leptin insensitivity and increased hypothalamic neuropeptide Y. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 25(11), 1680–1688. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801806>
4. Amoss, M., Burgus, R., Blackwell, R., Vale, W., Fellows, R., & Guillemin, R. (1971). Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 44(1), 205–210.
5. Anik, A., Çatlı, G., Abacı, A., & Böber, E. (2015). Effect of gonadotropin-releasing hormone agonist therapy on body mass index and growth in girls with idiopathic central precocious puberty. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 19(2), 267–271. <https://doi.org/10.4103/2230-8210.131770>
6. B. Heymsfield, S., Wang, Z., Baumgartner, R. N., & Ross, R. (1997). Human Body Composition: Advances in Models and Methods. *Annual Review of Nutrition*, 17(1), 527–558. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.17.1.527>
7. Basaria, S., Lieb, J., Tang, A. M., DeWeese, T., Carducci, M., Eisenberger, M., & Dobs, A. S. (2002). Long-term effects of androgen deprivation therapy in prostate cancer patients. *Clinical Endocrinology*, 56(6), 779–786.
8. Belchetz, P. E., Plant, T. M., Nakai, Y., Keogh, E. J., & Knobil, E. (1978). Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science (New York, N.Y.)*, 202(4368), 631–633.
9. Boxer, R. S., Kenny, A. M., Dowsett, R., & Taxel, P. (2005). The effect of 6 months of androgen deprivation therapy on muscle and fat mass in older men with localized prostate cancer. *The Aging Male*, 8(3–4), 207–212.

10. Brožek, J. M., & Henschel, A. (1961). *Techniques for Measuring Body Composition: Proceedings of a Conference, Quartermaster Research and Engineering Center, Natick, Massachusetts, January 22-23, 1959*. National Academies.
11. Calderón-Vallejo, D., & Quintanar, J. L. (2012b). Gonadotropin-releasing hormone treatment improves locomotor activity, urinary function and neurofilament protein expression after spinal cord injury in ovariectomized rats. *Neuroscience Letters*, 515(2), 187–190. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.03.052>
12. Carel, J.-C., Eugster, E. A., Rogol, A., Ghizzoni, L., & Palmert, M. R. (2009). Consensus Statement on the Use of Gonadotropin-Releasing Hormone Analogs in Children. *Pediatrics*, 123(4), e752–e762. <https://doi.org/10.1542/peds.2008-1783>
13. Casañ, E. M., Raga, F., Bonilla-Musoles, F., & Polan, M. L. (2000). Human Oviductal Gonadotropin-Releasing Hormone: Possible Implications in Fertilization, Early Embryonic Development, and Implantation. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85(4), 1377–1381. <https://doi.org/10.1210/jc.85.4.1377>
14. Chan, J. L., Heist, K., DePaoli, A. M., Veldhuis, J. D., & Mantzoros, C. S. (2003). The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(9), 1409–1421. <https://doi.org/10.1172/JCI17490>
15. Chen, A., Ganor, Y., Rahimipour, S., Ben-Aroya, N., Koch, Y., & Levite, M. (2002). The neuropeptides GnRH-II and GnRH-I are produced by human T cells and trigger laminin receptor gene expression, adhesion, chemotaxis and homing to specific organs. *Nature Medicine*, 8(12), 1421–1426. <https://doi.org/10.1038/nm801>
16. Cheng, C. K., & Leung, P. C. K. (2005). Molecular Biology of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and Their Receptors in Humans. *Endocrine Reviews*, 26(2), 283–306. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0039>
17. Chiumello, G., Brambilla, P., Guarneri, M. P., Russo, G., Manzoni, P., & Sgaramella, P. (2000). Precocious puberty and body composition: effects of GnRH analog treatment. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism: JPEM*, 13 Suppl 1, 791–794.
18. Clarke, I. J., & Pompolo, S. (2005). Synthesis and secretion of GnRH. *Animal Reproduction Science*, 88 (1–2), 29–55.
19. Conn, P. M., & Crowley, W. F. (1994). Gonadotropin-Releasing Hormone and Its Analogs. *Annual Review of Medicine*, 45(1), 391–405.

20. Counis, R., Garrel, G., Laverriere, J.-N., Simon, V., Bleux, C., Magre, S., & Cohen-Tannoudji, J. (2009). The GnRH receptor and the response of gonadotrope cells to GnRH pulse frequency code. A story of an atypical adaptation of cell function relying on a lack of receptor homologous desensitization. *Folia Histochemica et Cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*, 47(5), S81-87. <https://doi.org/10.2478/v10042-009-0109-9>
21. Cowley, M. A., Smith, R. G., Diano, S., Tschöp, M., Pronchuk, N., Grove, K. L., Horvath, T. L. (2003). The Distribution and Mechanism of Action of Ghrelin in the CNS Demonstrates a Novel Hypothalamic Circuit Regulating Energy Homeostasis. *Neuron*, 37(4), 649–661. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00063-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00063-1)
22. Cummings, D. E. (2006). Ghrelin and the short- and long-term regulation of appetite and body weight. *Physiology & Behavior*, 89(1), 71–84.
23. Díaz Galindo, C., Gómez-González, B., Salinas, E., Calderón-Vallejo, D., Hernández-Jasso, I., Bautista, E., & Quintanar, J. L. (2015). Leuprolide acetate induces structural and functional recovery of injured spinal cord in rats. *Neural Regeneration Research*, 10(11), 1819–1824. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.170311>
24. El Kholy, M., & Elsedfy, H. H. (2011). Effect of GnRH analogue on height potential in patients with severe growth hormone insensitivity syndrome treated with IGF-I. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism: JPEM*, 24(11–12), 983–988.
25. Ellis, K. J. (2000). Human body composition: in vivo methods. *Physiological Reviews*, 80(2), 649–680.
26. Elmquist, J. K., Bjørnbæk, C., Ahima, R. S., Flier, J. S., & Saper, C. B. (1998). Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 395(4), 535–547. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19980615\)395:4<535::AID-CNE9>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19980615)395:4<535::AID-CNE9>3.0.CO;2-2)
27. Fidanza, F., Keys, A., & Anderson, J. T. (1953). Density of body fat in man and other mammals. *Journal of Applied Physiology*, 6(4), 252–256.
28. Gevers, E. F., Wit, J.-M., & Robinson, I. C. A. F. (1998). Effects of Long-Term Gonadotropin-Releasing Hormone Analog Treatment on Growth, Growth Hormone (GH) Secretion, GH Receptors, and GH-Binding Protein in the Rat. *Pediatric Research*, 43(1), 111–120. <https://doi.org/10.1203/00006450-199801000-00017>
29. Greenbaum, A. L. (1953). Changes in body composition and respiratory quotient of adult female rats treated with purified growth hormone. *Biochemical Journal*, 54(3), 400–407.

30. Guan, X. M., Yu, H., Palyha, O. C., McKee, K. K., Feighner, S. D., Sirinathsinghji, D. J., ... Howard, A. D. (1997). Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 48(1), 23–29.
31. Guzmán-Soto, I., Salinas, E., Hernández-Jasso, I., & Quintanar, J. L. (2012a). Leuprolide acetate, a GnRH agonist, improves experimental autoimmune encephalomyelitis: a possible therapy for multiple sclerosis. *Neurochemical Research*, 37(10), 2190–2197. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0842-x>
32. Guzmán-Soto, I., Salinas, E., Hernández-Jasso, I., & Quintanar, J. L. (2012b). Leuprolide acetate, a GnRH agonist, improves experimental autoimmune encephalomyelitis: a possible therapy for multiple sclerosis. *Neurochemical Research*, 37(10), 2190–2197. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0842-x>
33. Hainer, V., Kunesová, M., Parízková, J., Stich, V., Mikulová, R., & Slabá, S. (2000). Respiratory quotient in obesity: its association with an ability to retain weight loss and with parental obesity. *Sbornik Lekarsky*, 101(1), 99–104.
34. Havel, R. J., Kane, J. P., & Kashyap, M. L. (1973). Interchange of Apolipoproteins between Chylomicrons and High Density Lipoproteins during Alimentary Lipemia in Man. *The Journal of Clinical Investigation*, 52(1), 32–38. <https://doi.org/10.1172/JCI107171>
35. Herbert, C. A., & Trigg, T. E. (2005). Applications of GnRH in the control and management of fertility in female animals. *Animal Reproduction Science*, 88(1), 141–153. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.05.007>
36. Hernandez, A. G. (DRT). (2010). *Tratado de nutricion / Nutrition Treatise: Nutricion humana en el estado de salud / Human Nutrition in Health Status*. Ed. Médica Panamericana.
37. Heymsfield, S. (2005). *Human Body Composition*. Human Kinetics.
38. Heymsfield, S. B., Lichtman, S., Baumgartner, R. N., Wang, J., Kamen, Y., Aliprantis, A., & Pierson, R. N., Jr. (1990). Body composition of humans: comparison of two improved four-compartment models that differ in expense, technical complexity, and radiation exposure. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 52(1), 52–58.
39. Heymsfield, S. B., Wang, Z., Baumgartner, R. N., & Ross, R. (1997). Human body composition: advances in models and methods. *Annual Review of Nutrition*, 17, 527–558. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.17.1.527>

40. Hohl, R., de Oliveira, R. B., Vaz de Macedo, D., & Brenzikofer, R. (2007). Apparatus for measuring rat body volume: a methodological proposition. *Journal of Applied Physiology*, 102(3), 1229–1234. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00744.2006>
41. Holliday, M. A., Potter, D., Jarrah, A., & Bearg, S. (1967). The Relation of Metabolic Rate to Body Weight and Organ Size. *Pediatric Research*, 1(3), 185–195. <https://doi.org/10.1203/00006450-196705000-00005>
42. Homma, H., Kurachi, H., Nishio, Y., Takeda, T., Yamamoto, T., Adachi, K., ... Murata, Y. (2000). Estrogen Suppresses Transcription of Lipoprotein Lipase Gene existence of a unique estrogen response element on the lipoprotein lipase promoter. *Journal of Biological Chemistry*, 275(15), 11404–11411. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.15.11404>
43. Jiang, J. M. Y., Sacco, S. M., & Ward, W. E. (2008). Ovariectomy-Induced Hyperphagia Does Not Modulate Bone Mineral Density or Bone Strength in Rats. *The Journal of Nutrition*, 138(11), 2106–2110. <https://doi.org/10.3945/jn.108.093781>
44. Karten, M. J., & Rivier, J. E. (1986). Gonadotropin-Releasing Hormone Analog Design. Structure-Function Studies Toward the Development of Agonists and Antagonists: Rationale and Perspective. *Endocrine Reviews*, 7(1), 44–66. <https://doi.org/10.1210/edrv-7-1-44>
45. Kitson, A. P., Marks, K. A., Henao, J. J. A., Tupling, A. R., & Stark, K. D. (2015). Prevention of hyperphagia prevents ovariectomy-induced triacylglycerol accumulation in liver, but not plasma. *Nutrition Research*, 35(12), 1085–1094.
46. Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., & Kangawa, K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 402(6762), 656–660. <https://doi.org/10.1038/45230>
47. Koolhaas, J. M. (2010). The Laboratory Rat. In R. Hubrecht & J. Kirkwood (Eds.), *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals* (pp. 311–326).
48. LaForgia, J., Gunn, S., & Withers, R. T. (2008). Body composition: validity of segmental bioelectrical impedance analysis. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 17(4), 586–591.
49. Lessey, B. A. (2000). Medical management of endometriosis and infertility. *Fertility and Sterility*, 73(6), 1089–1096. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(00\)00519-7](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(00)00519-7)

50. Licinio, J., Mantzoros, C., Negrão, A. B., Cizza, G., Wong, M. L., Bongiorno, P. B., Gold, P. W. (1997). Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary-adrenal function. *Nature Medicine*, 3(5), 575–579.
51. Litwak, S. A., Wilson, J. L., Chen, W., Garcia-Rudaz, C., Khaksari, M., Cowley, M. A., & Enriori, P. J. (2014). Estradiol prevents fat accumulation and overcomes leptin resistance in female high-fat diet mice. *Endocrinology*, 155(11), 4447–4460. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1342>
52. Matsuo, H., Baba, Y., Nair, R. M. G., Arimura, A., & Schally, A. V. (1971). Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 43(6), 1334–1339. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(71\)80019-0](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(71)80019-0)
53. Mead, J. R., Irvine, S. A., & Ramji, D. P. (2002). Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *Journal of Molecular Medicine*, 80(12), 753–769. <https://doi.org/10.1007/s00109-002-0384-9>
54. Meldrum, D. R., Chang, R. J., Lu, J., Vale, W., Rivier, J., & Judd, H. L. (1982). “medical oophorectomy” using a long-acting gnRH agonist-a possible new approach to the treatment of endometriosis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 54(5), 1081–1083. <https://doi.org/10.1210/jcem-54-5-1081>
55. Millar, R. P. (2005). GnRHs and GnRH receptors. *Animal Reproduction Science*, 88(1–2), 5–28. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.05.032>
56. Millar, R. P., & Newton, C. L. (2013). Current and future applications of GnRH, kisspeptin and neurokinin B analogues. *Nature Reviews Endocrinology*, 9(8), 451–466. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.120>
57. Modlesky, C. M., Cureton, K. J., Lewis, R. D., Prior, B. M., Sloniger, M. A., & Rowe, D. A. (1996). Density of the fat-free mass and estimates of body composition in male weight trainers. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, 80(6), 2085–2096.
58. Moorman, P. G., Schildkraut, J. M., Iversen, E. S., Myers, E. R., Gradison, M., Warren-White, N., & Wang, F. (2009). A prospective study of weight gain after premenopausal hysterectomy. *Journal of Women's Health (2002)*, 18(5), 699–708.
59. Müller, T. D., Nogueiras, R., Andermann, M. L., Andrews, Z. B., Anker, S. D., Argente, J., Tschöp, M. H. (2015). Ghrelin. *Molecular Metabolism*, 4(6), 437–460. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2015.03.005>

60. Nakazato, M., Murakami, N., Date, Y., Kojima, M., Matsuo, H., Kangawa, K., & Matsukura, S. (2001). A role for ghrelin in the central regulation of feeding: Article: Nature. *Nature*, 409(6817), 194–198. <https://doi.org/10.1038/35051587>
61. Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2017). *Lehninger Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman.
62. Novelli, E. L. B., Souza, G. A., Ebaid, G. M. X., Rocha, K. K. H. R., Seiva, F. R. F., Mani, F., Sforcin, J. M. (2010). Energy expenditure and oxygen consumption as novel biomarkers of obesity-induced cardiac disease in rats. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 18(9), 1754–1761. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.470>
63. Ohtsuka, S., Terakawa, N., Shimizu, I., Sakata, M., Mizutani, T., Miyake, A., Aono, T. (1989). Studies on GnRH agonist suppression of estrogen production in patients with endometriosis. *Endocrinologia Japonica*, 36(4), 611–619.
64. Pahl, P. (1969). Growth Curves for Body Weight of the Laboratory Rat. *Australian Journal of Biological Sciences*, 22(4), 1077–1080.
65. Park, H. K., Lee, H. S., Ko, J. H., Hwang, I. T., Lim, J. S., & Hwang, J. S. (2012). The effect of gonadotrophin-releasing hormone agonist treatment over 3 years on bone mineral density and body composition in girls with central precocious puberty. *Clinical Endocrinology*, 77(5), 743–748. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2012.04418.x>
66. Pedersen, S. B., Børglum, J. D., Møller-Pedersen, T., & Richelsen, B. (1992). Effects of in vivo estrogen treatment on adipose tissue metabolism and nuclear estrogen receptor binding in isolated rat adipocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 85(1–2), 13–19.
67. 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>
68. Robertson, S. A., Leininger, G. M., & Myers, M. G. (2008). Molecular and Neural Mediators of Leptin Action. *Physiology & Behavior*, 94(5), 637–642. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.04.005>
69. Santamarina-Fojo, S., & Brewer, H. B. (1994). Lipoprotein lipase: structure, function and mechanism of action. *International Journal of Clinical and Laboratory Research*, 24(3), 143–147. <https://doi.org/10.1007/BF02592444>
70. Schlaff, W. D., Carson, S. A., Luciano, A., Ross, D., & Bergqvist, A. (2006). Subcutaneous injection of depot medroxyprogesterone acetate compared with

- leuprolide acetate in the treatment of endometriosis-associated pain. *Fertility and Sterility*, 85(2), 314–325. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.07.1315>
71. Schneider, F., Tomek, W., & Gründker, C. (2006). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its natural analogues: a review. *Theriogenology*, 66(4), 691–709. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.03.025>
72. 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.
73. Shimizu, H., Ohtani, K., Kato, Y., Tanaka, Y., & Mori, M. (1996). Estrogen increases hypothalamic neuropeptide Y (NPY) mRNA expression in ovariectomized obese rat. *Neuroscience Letters*, 204(1–2), 81–84. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(96\)12322-3](https://doi.org/10.1016/0304-3940(96)12322-3)
74. Shook, R. P., Hand, G. A., Paluch, A. E., Wang, X., Moran, R., Hébert, J. R., Blair, S. N. (2016). High respiratory quotient is associated with increases in body weight and fat mass in young adults. *European Journal of Clinical Nutrition*, 70(10), 1197–1202. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2015.198>
75. Sinha, M. K., Ohannesian, J. P., Heiman, M. L., Kriauciunas, A., Stephens, T. W., Magosin, S., Caro, J. F. (1996). Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *Journal of Clinical Investigation*, 97(5), 1344–1347.
76. Siri, W. E. (1993). Body composition from fluid spaces and density: analysis of methods. 1961. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 9(5), 480–491; discussion 480, 492.
77. Smith, M. R. (2004a). Changes in fat and lean body mass during androgen-deprivation therapy for prostate cancer. *Urology*, 63(4), 742–745.
78. Smith, M. R., Finkelstein, J. S., McGovern, F. J., Zietman, A. L., Fallon, M. A., Schoenfeld, D. A., & Kantoff, P. W. (2002). Changes in body composition during androgen deprivation therapy for prostate cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87(2), 599–603.
79. Stoch, S. A., Parker, R. A., Chen, L., Bubley, G., Ko, Y.-J., Vincelette, A., & Greenspan, S. L. (2001). Bone Loss in Men with Prostate Cancer Treated with Gonadotropin-Releasing Hormone Agonists. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(6), 2787–2791. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.6.7558>

80. Szczurowicz, A., & Wydra, D. (1996). GnRH analogs in treating uterine leiomyomata and endometriosis. *Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology*, 23(4), 214–219.
81. Tanaka, T., Satoh, M., Yasunaga, T., Horikawa, R., Tanae, A., & Hibi, I. (1997). GH and GnRH analog treatment in children who enter puberty at short stature. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism: JPEM*, 10(6), 623–628.
82. *Texto de neurociencias cognitivas*. (2001). UNAM.
83. Tschöp, M., Wawarta, R., Riepl, R. L., Friedrich, S., Bidlingmaier, M., Landgraf, R., & Folwaczny, C. (2001). Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *Journal of Endocrinological Investigation*, 24(6), RC19-RC21.
84. Tschöp, Matthias, Smiley, D. L., & Heiman, M. L. (2000). Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*, 407(6806), 908–913. <https://doi.org/10.1038/35038090>
85. Wang, H., & Eckel, R. H. (2009). Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 297(2), E271–E288. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90920.2008>
86. Wang, Z. M., Pierson, R. N., & Heymsfield, S. B. (1992). The five-level model: a new approach to organizing body-composition research. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 56(1), 19–28.
87. Wegorzewska, I. N., Walters, K., Weiser, M. J., Cruthirds, D. F., Ewell, E., Larco, D. O., Wu, T. J. (2008). Postovariectomy weight gain in female rats is reversed by estrogen receptor α agonist, propylpyrazoletriol. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 199(1), 67.e1-67.e5. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2007.11.054>
88. Wei, A., Fascetti, A. J., Kim, K., & Ramsey, J. J. (2014). Post-castration variations in weight gain in a cohort of young adult male cats. *Journal of Nutritional Science*, 3. <https://doi.org/10.1017/jns.2014.37>
89. 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>
90. Yamasaki, H., Douchi, T., Yamamoto, S., Oki, T., Kuwahata, R., & Nagata, Y. (2001). Body fat distribution and body composition during GnRH agonist therapy. *Obstetrics and Gynecology*, 97(3), 338–342.
91. Yu, W. H., Kimura, M., Walczewska, A., Karanth, S., & McCann, S. M. (1997). Role of leptin in hypothalamic–pituitary function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(3), 1023–1028.

92. Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372(6505), 425–432. <https://doi.org/10.1038/372425a0>



9. ANEXOS

ANEXO A. CARTA DE ACEPTACIÓN DE ARTÍCULO CIENTÍFICO

SPANDIDOS PUBLICATIONS UK LTD

5-6 Kings Street Cloisters
Clifton Walk
London W6 0GY
Tel +44 (0)20 7262 8050
Fax +44 (0)20 7262 9825
Registered Number 7341997 England

Av. Universidad 940 C.P. 20131
Aguascalientes,
Ags.

March 01, 2017

Our reference: 181914

Journal: Experimental and Therapeutic Medicine

Title: Changes in body composition and mRNA expression of ghrelin and lipoprotein lipase in rats treated with leuprolide acetate, a GnRH agonist.

Authors: Professor Carlos Olvera-Sandoval, Dr Gabriel Betanzos-Cabrera, Dr Rafael Casilla-Peñuelas, Dr J. Luis Quintanar

Dear J. Luis Quintanar,

Thank you for your submission. The manuscript 'Changes in body composition and mRNA expression of ghrelin and lipoprotein lipase in rats treated with leuprolide acetate, a GnRH agonist.' by Olvera-Sandoval et al was provisionally accepted for publication in Experimental and Therapeutic Medicine on March 01, 2017. The submission should be considered to be formally accepted upon the receipt of proofs.

An author PDF file will be provided on publication.

Yours Sincerely,

Demetrios A. Spandidos

SPANDIDOS PUBLICATIONS UK LTD
5-6 KING STREET CLOISTERS
LONDON, W6 0GY, UNITED KINGDOM
VAT: 996278548
TEL: +442072628050 FAX: +442072629825

ANEXO B. MANUSCRITO

Effect of leuprolide acetate, a GnRH agonist, on body composition and mRNA expression of ghrelin and lipoprotein lipase in rats

Carlos Olvera-Sandoval¹, Gabriel Betanzos-Cabrera², Rafael Casillas-Peñuelas¹ and J. Luis Quintanar^{1,*}

¹ Neurophysiology Laboratory, Department of Physiology and Pharmacology, Basic Science Center. Universidad Autónoma de Aguascalientes, México.

² Nutrigenomics Laboratory, Academic Area of Nutrition, Health Sciences Institute, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.

* Corresponding author:

Dr. J. Luis Quintanar

Depto. de Fisiología y Farmacología, Centro de Ciencias Básicas.

Universidad Autónoma de Aguascalientes

Av. Universidad 940 C.P. 20131

Col. Ciudad Universitaria

Aguascalientes, Ags. México

Phone and Fax: 0052 (449) 9 10 84 23

E-mail: jlquinta@correo.uaa.mx

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

OLVERA et al: EFFECT OF LEUPROLIDE ACETATE, A GnRH AGONIST, ON BODY COMPOSITION AND MRNA EXPRESSION OF GHRELIN AND LIPOPROTEIN LIPASE IN RATS

Abstract

Leuprolide acetate a GnRH agonist causes changes in body weight in experimental and clinical trials, however, there are no studies properly directed on body composition analysis. The aim of this study was to evaluate a long-term effect of leuprolide acetate administration on body composition and the mRNA expression of ghrelin and lipoprotein lipase (LPL) in rats. Ovariectomized (OVX), ovariectomized with treatment (OVX+LA), non-ovariectomized (CTRL) and non-ovariectomized with treatment (LA) rats were used. We use 5µg/kg i.m. of leuprolide acetate every 72 h during 120 days. Body composition determinations and mRNA expression of ghrelin and lipoprotein lipase were performed. We found significant changes in body composition after treatment, OVX group increased their weight at 51 % while LA group was 47 %, OVX+LA and CTRL 38 % and 33 % respectively compared to baseline. The analysis of FM was 14 % higher for LA vs CTRL, and 19 % higher for OVX vs OVX+LA, while FFM was higher in LA group compared to CTRL while OVX and OVX+LA showed similar results. At 120 days of treatment, LA group had an up-regulation around 70 % of mRNA expression than CTRL while OVX+LA resulted with a down-regulation in comparison to OVX group at 120 days; the results of LPL mRNA expression were similar to ghrelin. We confirm changes in body composition and mRNA expression of ghrelin and LPL caused by leuprolide acetate administration in long-term. Possibly this condition contribute to regulate food consumption and a subsequent control over adipogenesis.

Key words: leuprolide acetate; ovariectomy; body composition; ghrelin; lipoprotein lipase.

Introduction

Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) is a decapeptide originally discovered as a factor of hypothalamic origin that controls secretions of the anterior pituitary gland. GnRH has a direct effect on reproductive processes by regulating synthesis and release of pituitary

gonadotropins. In addition to this, it has been reported that GnRH has neurotrophic properties on dendritic spine density and in cultured cerebral neurons of rat embryos by increasing growth and neurite number, modifying neurofilament expression (1,2).

On the other hand, several synthetic GnRH agonists, designed for increased biologic effect have been used with different therapeutics applications e.g., oncological treatments, precocious puberty, *in vitro* fertilization techniques and others (3).

Leuprolide acetate (LA) is a synthetic analog of GnRH formed by nine aminoacids with a high biological effect due to its increased affinity to GnRH receptors and its prolonged action compared to endogenous GnRH (3,4). This agonist has an increased resistance to enzymatic degradation and a high protein binding due to its non-natural aminoacids and prolonged serum half-life (5,6). This agonist has been previously used for the same purposes mentioned above (7). Likewise, has been used as a neurological recovery factor in experimental autoimmune encephalomyelitis and in spinal cord injury (8-10).

There are evidence that therapeutic applications in humans and experimental models, that GnRH or agonists administration has the secondary effect of increasing body weight (8,9,11). The mechanisms involved in this process are not clear, however, in the last two decades different approaches have been proposed to elucidate the relationship between energy balance and adipogenesis trying to correlate endocrine and metabolic pathways. In this sense, the development of adipogenesis in non-pathological conditions responds to a high food consumption and loss of physical activity. Under this concept ghrelin an orexigenic peptide, plays a fundamental role acting in the brain regulating food intake, body weight, adiposity, and glucose metabolism (12). On the other hand, lipoprotein lipase (LPL) is an enzyme with many physiological activities mainly regulating the supply of fatty acids to various tissues for either storage or oxidation (13). Changes in ghrelin and LPL expression depends on physiological stages and probably under GnRH agonists stimuli, this condition can favored to increase or suppress food consumption and changes in body weight. However, it is necessary to know the main changes in body composition that occur in treatments with this agonist and the implications that might have in neuroregeneration studies, where weight gain possibly is associated with a better recovery or similarly in other therapeutics applications like oncological, fertility or precocious puberty treatments, in which is necessary have a nutritional care in order to control undesired effects. We hypothesized that long-term

use of leuprolide acetate may generate changes in body composition and modify the mRNA expression of ghrelin and lipoprotein lipase, two important molecules with high repercussion in the control of hunger and adipogenesis. In order to elucidate this assumption, the aim of this study was to evaluate a long-term effect of LA administration on body composition and determine the mRNA expression of ghrelin and LPL in non-ovariectomized and ovariectomized rats.

Methods

Animal groups and housing conditions

Ninety six female Wistar rats (120-150 g), 6 weeks old, were used and treated according to the Institutional Normative Welfare Standards at Aguascalientes University, México. They were maintained in separated cages with controlled conditions ($23^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$) with alternative dark and light cycle. They were fed with a standard rodent pellets (Nutricubes® Purina) and water *ad libitum*. The animals were divided in four groups: untreated (CTRL), treated with Leuprolide Acetate (LA), ovariectomized (OVX) and ovariectomized treated with Leuprolide Acetate (OVX+LA). All rats were habituated for 10 days prior to the experiment.

Ovariectomy and Leuprolide Acetate administration

On the 10th day of habituation, two groups of animals were surgically ovariectomized. After, the animals were kept in a stable and clean environment and were allowed to recover for 10 days from the surgery. For LA and OVX+LA groups the treatment with Leuprolide Acetate (Sigma-Aldrich, USA) began on day 20 with the administration of $5\mu\text{g/kg}$ i.m. in 0.1 ml of saline solution (0.9 % NaCl) every 3 days until day 120. The other two groups, CTRL and OVX received only saline solution with the same treatment scheme.

Murinometric evaluations and nutritional measurements

Food consumption (g/24 h/100 g) was measured daily at the same time (between 09:00 - 10:00 h) and body weights were measured once a week to adjust leuprolide acetate dose and to observe weight changes in treated and non-treated groups during all experiment. Food was weighed in a digital balance (500 g capacity x 0.1 g, Ohaus V31X501, Parsippany, USA). Body length (nose–anus length) was determined in all groups at 0, 20, 40, 60, 80, 100

and 120 days of experiment with a metric tape fixed to a worktable. Body weight and body length were used to determine body mass index ($BMI = g/cm^2$) and ponderal index ($PI = g^3/\sqrt{cm}$). Animal weight and food consumption was used to determine specific rate of body mass gain (g/kg), all measures were used according to equations described by Novelli *et al* 2007, where specific rate of body mass gain is expressed by: $(g/kg) = dM/Mdt$, where dM represents the gain of body weight during $dt = t_2 - t_1$ and M is the rat body weight at t_1 (14).

Body composition analysis *in vivo*

Body composition changes were registered *in vivo* throughout the different evaluation periods. To determine body density, hydrostatic weighing was performed each 20th day until day 120 as reported by Hohl *et al* 2007 (15). Briefly, a device with two graduated cylinders linked by a flexible hose where the rat was placed inside of one and changes in water volume in both cylinders are recorded. Recommendations for calibration and animal measurements were followed. Once the animals' density was determined, a densitometry-based equation was used to calculate fat mass (16). The data obtained were converted to grams in order to compare the values with those from the dissection study. In this study, fat free mass was considered as the difference between total body weight and fat mass.

Carcass analysis and chemical lipid extract

Each 20th day, four rats from each group were sacrificed under anesthesia. Blood samples were collected from central aorta and weighed to calculate residual mass. Rats were eviscerated and skin was completely dissected from neck region until front and rear trunnions. All components were weighed in a calibrated balance (500 g capacity x 0.1 g, Ohaus V31X501, Parsippany, USA) and were classified under following criteria: the carcass was considered a major component of fat free mass (FFM), skin previously shaved as fat mass component (FM) and a third component: residual mass (RM) formed by blood and viscera weights. From the skin, previously dissected fat mass was extracted in accordance with the Bligh and Dyer method, which consists in a homogenized mixture carried out with 1:2:1 methanol:chloroform:tissue (15).

RNA isolation and RT-PCR assay

Total RNA was isolated by tissue disruption with TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) from samples of stomach and central aorta to measure ghrelin and

lipoproteinlipase respectively. The reverse transcriptase (RT) reactions, were performed with a High Capacity cDNA RT kit (Applied Biosystems: Cat. 4,368,813) using 3 µg of RNA with 0.8 µl of 25× dNTPs (100 mM), 2 µl 10× random primers, 2 µl 10× RT buffer and 1 U of Multiscribe RT in a final volume reaction of 20 µl completed with nuclease-free water using a thermocycler (Techne Genius: FGEN02TP) with the following incubation conditions: 25 °C/10 min, 37 °C/120 min, 85 °C/5 min. Each polymerase chain reaction (PCR) was performed in 25 µl of final volume with 0.25 µl of cDNA, 10X PCR Buffer Minus Mg, 10 mM dNTPs mix, 50 mM MgCl₂, 10 µM of each ghrelin, LPL and GAPDH specific primer and 0.125 U of Taq polymerase. A 347 bp DNA fragment coding for rat ghrelin was amplified with forward primer 5'-TTG AGC CCA GAG CAC CAG AAA-3' and reverse primer 5'- AGC TTC TGC CTC CTC TGC AAC T -3', oligonucleotide designed from the sequence of gene (GenBank, accession number AB029433.1). In the case of LPL a 292 bp DNA fragment was amplified with forward primer 5'-CCC CAG CAA GGC ATA CAG GT-3' and reverse primer 5'-CGG CAG GGT GAA GGG AAT GT-3', oligonucleotide designed from the sequence of gene (GenBank, accession number NM_012598.2). As an internal control for amplification, a fragment of 207 bp rat GAPDH was amplified from the same cDNA, forward primer 5'-AGA CAG CCG CAT CTT CTT GT-3' and reverse primer 5'-CTT GCC GTG GGT AGA GTC AT-3' designed from the sequence of gene (GenBank, accession number NM_017008.4). Optimal PCR conditions were 35 cycles of 94 °C/30 s, 56 °C/30 s, and 72 °C/ 30 s. PCR products were analyzed in ethidium bromide-stain agarose gels (2 %). Intensity of the amplified bands was analyzed using QuantityOne® software. Band intensities were normalized to GAPDH signal (Ghrelin/GAPDH and LPL/GAPDH rates). The results were analyzed by a one-way ANOVA with a Tukey test.

Statistical analysis

Data are expressed as means ±SEM. Data were with two-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post-test using GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) in most experiments. Significant differences were assumed for $p < 0.05$.

Results

Body weight, length, food consumption and specific weight gain.

From day 40 of treatment, all groups showed significant differences in body weight until the end of the experiment, the highest weight gain was found in OVX, OVX+LA and

LA groups (53.3 %, 40.25 % and 42.1 % respectively) compared to CTRL group (32.3%). At the end of the experiment groups treated with LA had higher weight compared to their equivalent groups who received NaCl 0.9% (Fig. 1). Regarding to analysis of length, the LA group had considerable increase but without significant differences. Apparently, animals that received leuprolide injections had lightly incremented their body length in comparison whit untreated animals (Fig. 2).

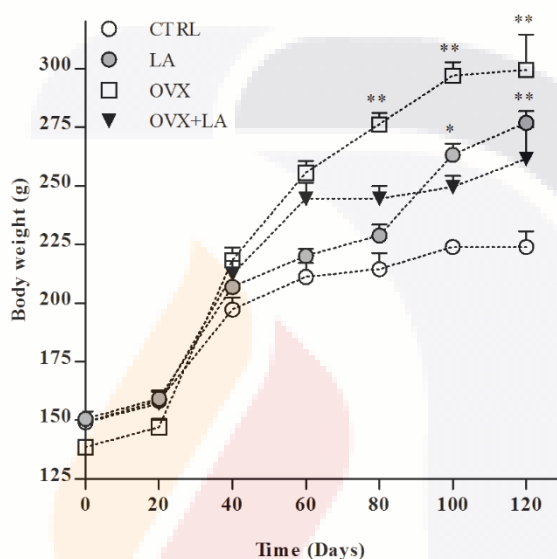


Fig. 1 Body weight changes with leuprolide acetate administration (5 µg/kg/each 3 days) during 120 days. Results are presented as mean ± SEM of body weight throughout the experimental period in non-ovariectomized and ovariectomized groups. Comparisons were made between equivalent groups (CTRL vs LA and OVX vs OVX+LA). Statistical Significance: *p<0.01; **p<0.001 (2way ANOVA-Bonferroni test).

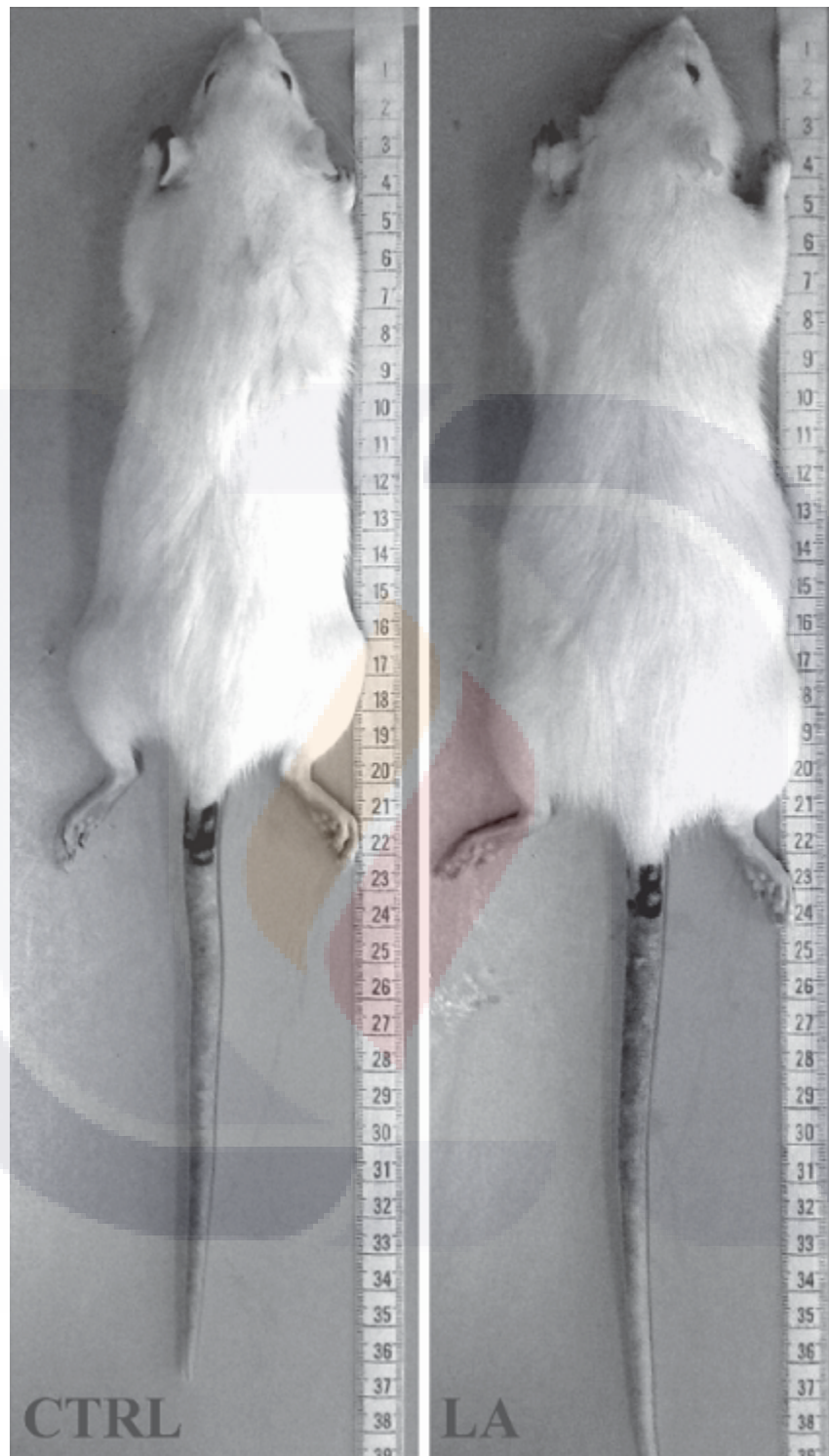


Fig. 2 Representative image comparing length of an intact CTRL and intact LA rats at 120 days of leuprolide acetate treatment. Nose-anus length was measured during all experiment.

Food consumption (FC) was positively correlated with body weight (BW) as shown in figure 3-A. Both LA and OVX+LA groups were found to have a positive correlation between intake and weight gain in the last three sacrifices. The OVX group consumed more food and gained more weight compared to CTRL group which practically did not change their food consumption and weight gain was minimum (FC vs. BW, $r = 0.874$, $P < 0.0001$). Specific rate of body mass gain was higher in OVX animals compared to the other groups during the entire experiment. No significant differences were observed between CTRL and LA, however, the OVX+LA group showed an important reduction in weight gain compared to the OVX group in all experiments with significant differences on day 80 (OVX 7.51 ± 0.19 vs. OVX+LA 6.33 ± 0.26 g; $P < 0.05$; Fig. 3-B) and 100 day of treatment (OVX 7.53 ± 0.26 vs. OVX+LA 6.25 ± 0.15 g; $P < 0.05$; Fig. 3-B).

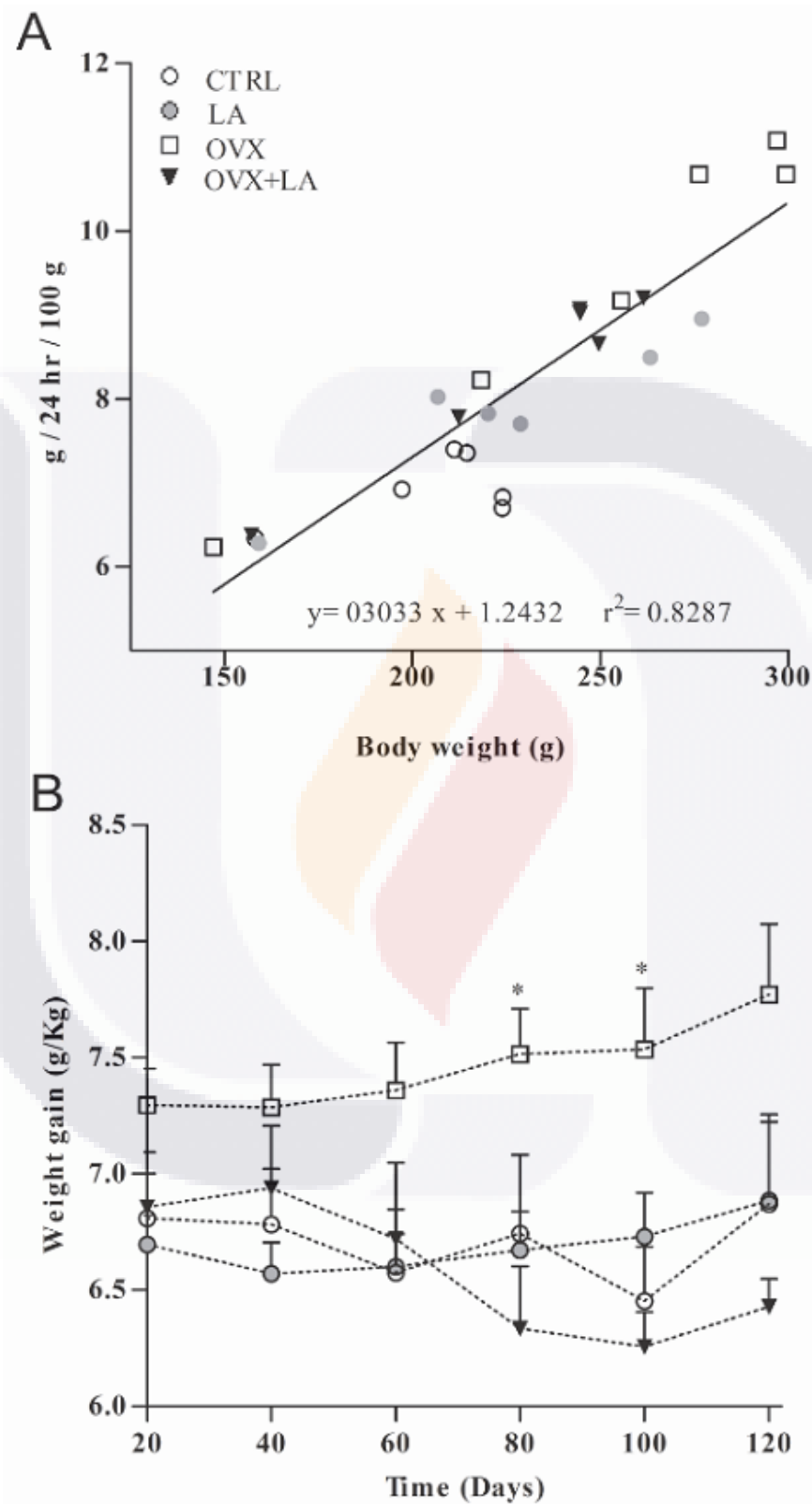


Fig. 3 A) Regression analysis of food consumption (g/24 h/100 g) and body weight (g) in all experiment in non-ovariectomized and ovariectomized rats. A significant relationship was observed in food consumption and body weight. B) Specific rate of body mass gain represented as mean $\pm$ SEM. Comparisons were represented between equivalent groups (CTRL vs LA and OVX vs OVX+LA). Statistical Significance: * $p < 0.05$; (2way ANOVA-Bonferroni test).

Body composition measured by hydrodensitometry

Significant differences for fat free mass and fat mass were observed on days 80 and 100 in all study groups. Fat mass was higher 18.3 in LA animals compared to CTRL at day 100 ($P < 0.05$; Fig. 4) and 23.3 % at 120 days ($P < 0.05$; Fig. 4). It was found that the OVX+LA group had less fat mass compared to the OVX group on days 80, 100 and 120. At the end of the experiment, the OVX group increased to 15.6 % compared to OVX+LA group ($P < 0.01$; Fig. 4).

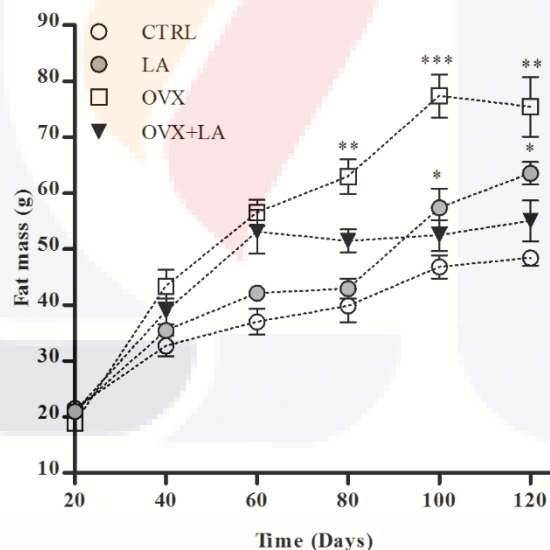


Fig. 4 Fat mass determined by hydrodensitometry represented as mean $\pm$ SEM. Comparisons were represented between equivalent groups (CTRL vs LA and OVX vs OVX+LA). Statistical Significance: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.001$ (2way ANOVA-Bonferroni test).**

Carcass analysis and total lipid extract from skin

All groups had substantial changes in carcass, residual mass and skin weights compared to CTRL animals. However, analyses from equivalent groups for each component showed significant differences for skin weight in the case of LA vs. CTRL at day 100 (36.2 ± 1.0 vs. 28.5 ± 0.3 g; $P < 0.05$) and 120 (38.6 ± 2.3 vs. 28.4 ± 0.9 g; $P < 0.01$; data not shown). No substantial differences were found between OVX and OVX+LA, though, at day 120 both groups had higher values than CTRL and LA. At the end of experiment carcass weight of LA group increased approximately 44 % while CTRL carcass weight 32.1 % (Fig. 5). Under the same analysis, carcass weight in OVX group had an increase of around 48.6 % compared to OVX+LA animals, which only increased 39.3 % (Fig. 5).

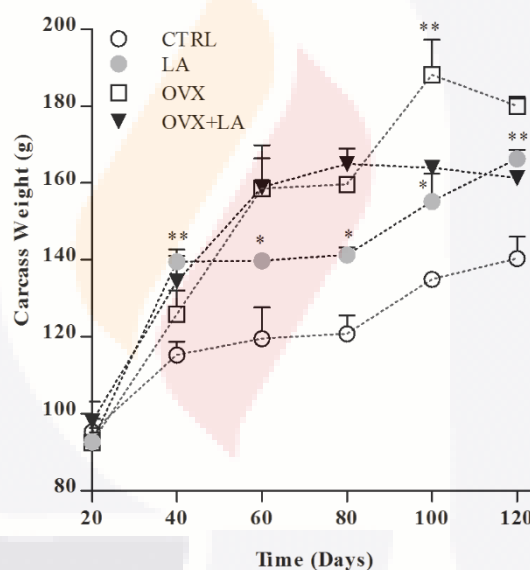


Fig. 5 Assay of carcass weight from dissection study considering this tissue as a major component of fat free mass. Four rats were used each 20 days per group for assay dissection. Data are represented as mean $\pm$ SEM and comparisons were made between equivalent groups (CTRL vs LA and OVX vs OVX+LA). Statistical Significance: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; (2way ANOVA-Bonferroni test).

Ponderal index was positively correlated with lipid extract from skin ($r = 0.7603$, $P < 0.0001$; Fig. 6) where the highest relation between ponderal index and lipid extract from skin was presented in OVX animals while the lowest relation was in CTRL group. Both leuprolide acetate treated groups, LA and OVX+LA, had similar results on this correlation (Fig. 6).

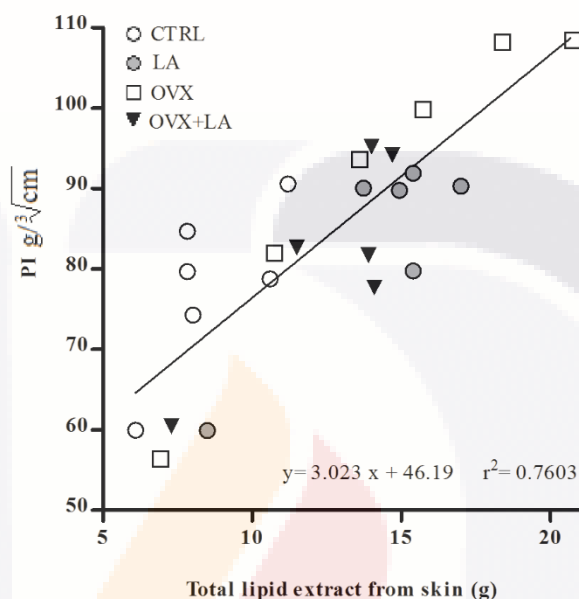


Fig. 6 Regression analysis of ponderal index (g^3/cm^3) and total lipid extract (g) in all measures for each groups from 0 to 120 days. There was positive relationship of ponderal index with lipid extract from skin.

Ghrelin and LPL mRNA expression

As shown in figure 7-A, ghrelin mRNA expression increased 70 % in LA group compared against CTRL group at the end of experiment ($P < 0.01$) while OVX+LA resulted with 27 % less ghrelin mRNA expression in comparison with OVX group ($P < 0.05$). Indeed OVX group had the highest ghrelin mRNA expression among the others. Similar results obtained in LPL mRNA measurements (Fig. 7-B); the LA group resulted a 40 % higher expression than CTRL group ($P < 0.05$), and interestingly OVX+LA showed a 55 % less expression in comparison to OVX ($P > 0.01$). All the results of mRNA expression normalized with the GAPDH constitutive gene.

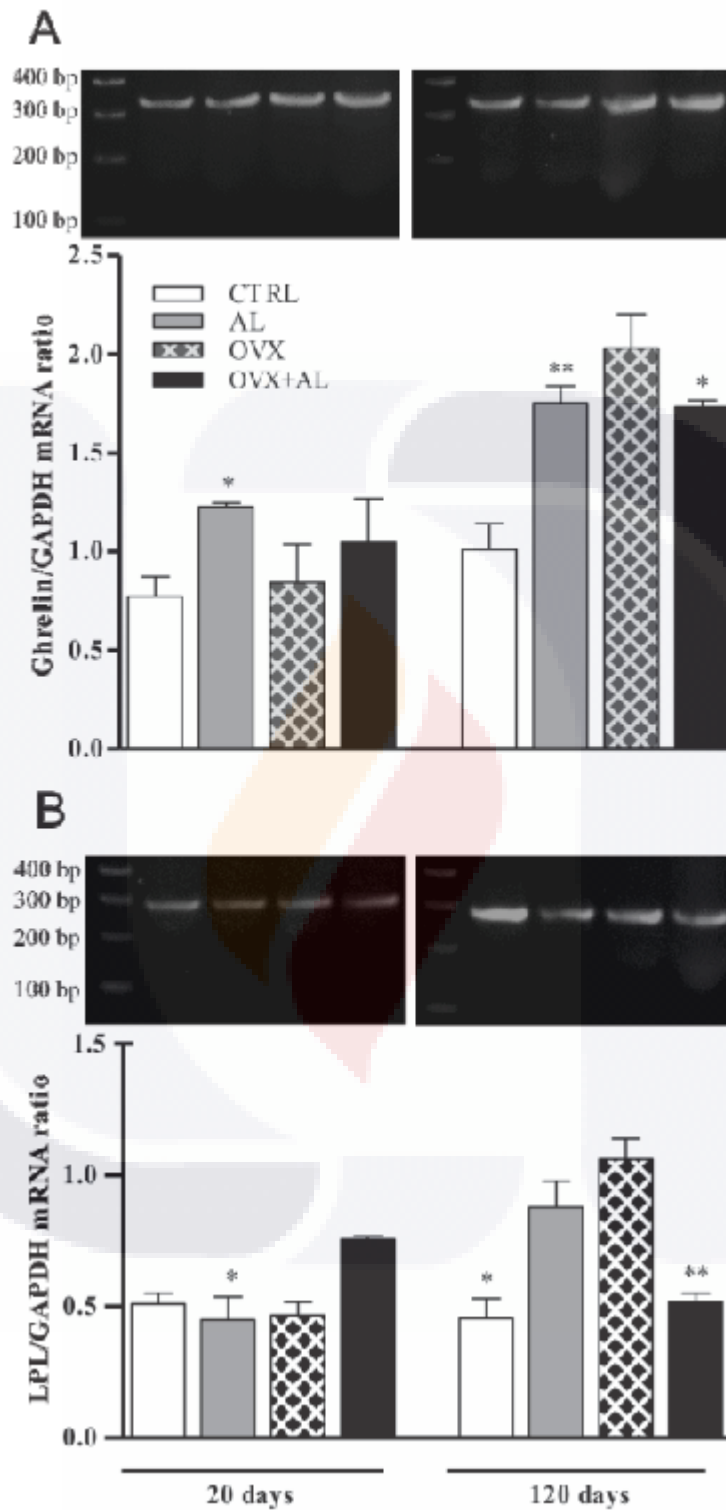


Fig. 7 Changes in ghrelin and LPL mRNA expression at 20 and 120 days of the experiment. A) Ghrelin PCR products (347 bp) and mRNA expression. B)

Lipoproteinlipase PCR products (292 bp) and mRNA expression. Data are presented as mean $\pm$ SEM and comparisons were made between equivalent groups (CTRL vs LA and OVX vs OVX+LA). Statistical Significance: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; (1way ANOVA-Tukey test).

Discussion

It has been reported that leuprolide acetate is a safe method for treating certain types of cancer and hormonal disorders associated to reproductive system (7). Recently, GnRH and its agonist leuprolide acetate, have been used in experimental studies of neuronal regeneration (8,10,18). However, weight gain is one of the side effects reported more frequently by these treatments and little attention has been addressed on body composition and possible responsible pathways. This study has demonstrated that leuprolide acetate promote changes in body composition both in non-ovariectomized rats and ovariectomized rats and variations in mRNA expression of ghrelin and LPL. We found that long-term leuprolide acetate administration causes an increase in body weight in LA rats compared with those CTRL. This subsequent effect has been reported in humans mainly in treatments for precocious puberty using GnRH and leuprolide acetate (17,18), cancer (21,22) and fertility regulation (23,24).

On the other hand, OVX group showed the highest weight gain compared to other groups (CTRL, OVX+LA and LA). Ovariectomy by itself causes this condition and this has been reported in other studies (25). Nguyen *et al* 2004 (26), reported an increase of 53 % in body weight in cats after ovariectomy compared to only 27% from a sham surgical intervention was observed. Apparently this increase in corporal weight is highly correlated with food consumption. In our study a positive relationship was observed between high food consumption and heavier animals, which was also supported by the specific weight gain, with the OVX group's weight being higher during the entire experiment. Jiang *et al* 2008 (27), in an osteoporosis model induced by ovariectomy, found that hyperphagia is the main cause of gain weight in Sprague-Dawley rats. An outcome to highlight is the stabilization in weight gain for animals OVX+LA, which since day 60 of treatment had minimum variations until the end of experiment.

Regarding the body composition by hydrodensitometry, we found an increase of FM in the LA group at the end of the experiment and no difference was found in FFM when compared to the CTRL group. In clinical trials with androgen deprivation therapy using leuprolide acetate to treat prostate cancer, an increase in weight and FM measured by dual-energy x-ray absorptiometry and bioelectrical impedance devices has been reported (22,28). It is well established that long-term therapy with GnRH agonists causes a desensitization of the pituitary gonadotrophs, which leads to a complete or acute lack of response of FSH or LH in eugonadal subjects (29). This condition restrains gonadal steroidal production avoiding a negative feedback at hypothalamic level in GnRH secretion (28). However, not only steroidal production exerts this function, Shimizu *et al.*, (29) showed that reduced levels of circulating estradiol (E_2) in response to total bilateral ovariectomy, increases the mRNA expression of neuropeptide Y (NPY) at hypothalamic level. It is possible that NPY, an orexigenic peptide, could induce hyperphagia with subsequent weight gain. This fact could explain the weight gain in the AL group in which long-term administration of leuprolide acetate, partially decreased the production of E_2 and favored an increase in food consumption. It has reported that decreasing E_2 causes not only an overproduction of NPY, but also an impaired leptin sensitivity in ovariectomized rats (30). Currently, estrogens replacement has been studied as a way to prevent increase in body weight both in experimental and clinical trials (31,32). Nevertheless, in our study, the OVX+LA group resulted in less FM and FFM compared to the OVX group.

To confirm the previous *in vivo* assays, the dissection study showed that LA group had higher FFM (carcass weight) and FM (skin weight) than CTRL group, while the OVX+LA and OVX groups resulted in similar skin weight but carcass weight did not change from day 60 on. Several studies indicate that GnRH agonists therapy modify body composition in which FM is the main affected component with slight reductions in FFM (34,20,35,36). However, these treatments were carried out to treat specific pathophysiological conditions with no diet control. Additionally, we found a positive correlation between PI and total lipid extract from the skin, which means that animal size, is not only related to this indicator but also to a FM under skin.

Currently, there is no evidence of the use of GnRH agonists after ovariectomy or its direct effects on body composition in the long-term in this condition. Furthermore, recent

findings report that GnRH can play different roles outside the hypothalamus-pituitary-reproductive-axis (33).

In our study, we found an increased ghrelin mRNA expression in LA animals, which also presented high food consumption and weight gain in comparison with CTRL animals. Until now, commercial leuprolide acetate preparations warn about rapid weight gain during treatments for example in central precocious puberty (19,39), but these phenomena are not well explained. We find that a long-term therapy of LA increases ghrelin mRNA expression, which probably leads to hyperphagia and a subsequent weight gain with body composition changes as previously mentioned. Intake, body weight, fat mass gain as we observed in our experiment (40). In addition, we noticed a highly mRNA ghrelin and LPL expression in OVX group even more than LA group. Interestingly, as well as ghrelin, LPL mRNA expression was higher in LA compared with CTRL group. This condition can favored to an increase of weight gain an FM deposition due to high LPL activity. There are studies indicating the effect of ghrelin administration and how can modify food previously mentioned suppression of estrogens is associated with obesity development in mammals and there is evidence that estrogen can block transcription of LPL gene (41–43). However, we thought that leuprolide acetate has different effect in OVX+LA animals because we found a down-regulation both ghrelin and LPL mRNA expression at levels similar to LA group at the end of experiment, which probably, permitted decrease food consumption and less FM deposition which in fact correspond to our findings of body composition. We hypothesized that maybe exists a replacement of steroidal secretion stimulated by leuprolide acetate administration in ovariectomized rats in other specialized tissues, this supported by findings of GnRH receptor outside of hypothalamic-pituitary-reproductive axis (38).

In summary, administration of leuprolide acetate in long-term promotes changes in weight and body composition in ovariectomized and non-ovariectomized rats. Also promotes increments in mRNA expression of ghrelin and LPL in non-ovariectomized animals while a down regulation is presented in ovariectomized animals with the same treatment, probably, this variation can affect food consumption and adipogenesis. This is one of the first studies describing the direct effect of leuprolide acetate on body composition in long-term, taking into consideration a controlled diet and the absence of pathophysiological events. Currently, the use of leuprolide acetate in therapeutic applications is widespread throughout the world,

and experimental models of this type may serve to elucidate the mechanisms involved in changes in body composition or for nutritional prophylaxis in subjects treated with GnRH analogs. To explain the mechanisms implied to this phenomenon, further experiments should be performed.

Acknowledgements

We express our sincere gratitude to Moisés Altamira-Camacho and Irma Hernández-Jasso for the technical support.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Disclaimer statement

Contributors: All authors contributed equally.

Funding: This study was supported by a grant from the National Council of Science and Technology Mexico (CONACYT), Grant Number 467237.

Ethics approval: The paper has received approval from the University of Aguascalientes, México, and Ethics Committee.

References

1. Quintanar JL, Salinas E: Neurotrophic Effects of GnRH on Neurite Outgrowth and Neurofilament Protein Expression in Cultured Cerebral Cortical Neurons of Rat Embryos. *Neurochem Res* 33(6):1051–6, 2007.
2. Prange-Kiel J, Jarry H, Schoen M, Kohlmann P, Lohse C, Zhou L, Rune GM: Gonadotropin-releasing hormone regulates spine density via its regulatory role in hippocampal estrogen synthesis. *J Cell Biol* 180(2):417–26, 2008.
3. Michael Conn PD, William F. Crowley MD Jr.: Gonadotropin-Releasing Hormone and Its Analogs. *Annu Rev Med* 45(1):391–405, 1994.
4. Periti P, Mazzei T, Mini E: Clinical pharmacokinetics of depot leuporelin. *Clin Pharmacokinet* 41(7):485–504, 2002.
5. Sennello LT, Finley RA, Chu SY, Jagst C, Max D, Rollins DE, Tolman KG: Single-dose pharmacokinetics of leuprolide in humans following intravenous and subcutaneous administration. *J Pharm Sci* 75(2):158–60, 1986.

6. Lønning PE, Lien EA. Pharmacokinetics of anti-endocrine agents. *Cancer Surv.* 17:343–70, 1993.
7. Wilson AC, Meethal SV, Bowen RL, Atwood CS: Leuprolide acetate: a drug of diverse clinical applications. *Expert Opin Investig Drugs* 16(11):1851–63, 2007.
8. Guzmán-Soto I, Salinas E, Hernández-Jasso I, Quintanar JL: Leuprolide Acetate, a GnRH Agonist, Improves Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: A Possible Therapy for Multiple Sclerosis. *Neurochem Res* 37(10):2190–7, 2012.
9. Calderón-Vallejo D, Quintanar JL: Gonadotropin-releasing hormone treatment improves locomotor activity, urinary function and neurofilament protein expression after spinal cord injury in ovariectomized rats. *Neurosci Lett* 515(2):187–90, 2012.
10. Díaz Galindo C, Gómez-González B, Salinas E, Calderón-Vallejo D, Hernández-Jasso I, Bautista E, Quintanar JL: Leuprolide acetate induces structural and functional recovery of injured spinal cord in rats. *Neural Regen Res* 10(11):1819–24, 2015.
11. Gevers EF, Wit J-M, Robinson ICAF: Effects of Long-Term Gonadotropin-Releasing Hormone Analog Treatment on Growth, Growth Hormone (GH) Secretion, GH Receptors, and GH-Binding Protein in the Rat. *Pediatr Res* 43(1):111–20, 1998.
12. Müller TD, Nogueiras R, Andermann ML, Andrews ZB, Anker SD, Argente J, Batterham RL, Benoit SC, Bowers CY, Broglio F: Ghrelin. *Mol Metab* 4(6):437–60, 2015.
13. Wang H, Eckel RH: Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* 297(2):E271–88, 2009.
14. Novelli ELB, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GMX, Rodrigues HG, Mani F, Fernandes AaH, Cicogna AC, Filho JLBV: Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim* 41(1):111–9, 2007.
15. Hohl R, Oliveira RB de, Macedo DV de, Brenzikofer R: Apparatus for measuring rat body volume: a methodological proposition. *J Appl Physiol* 102(3):1229–34, 2007.
16. Muscaritoli M, Gleason J, Meguid M, Lukaski H: Densitometry-based equations for estimating body composition in Fischer rats. *Basic Nutr Investig* 9(5):439–45, 1993.
17. Bligh EG, Dyer WJ: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37(8):911–7, 1959.

18. Lee SJ, Yang EM, Seo JY, Kim CJ: Effects of Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist Therapy on Body Mass Index and Height in Girls with Central Precocious Puberty. *Chonnam Med J* 48(1):27–31, 2012.
19. Neely EK, Lee PA, Bloch CA, Larsen L, Yang D, Mattia-Goldberg C, Chwalis K: Leuprolide Acetate 1-Month Depot for Central Precocious Puberty: Hormonal Suppression and Recovery. *Int J Pediatr Endocrinol* [cited 2016 Jun 9]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3062984/>, 2010.
20. Basaria S, Lieb J, Tang AM, DeWeese T, Carducci M, Eisenberger M, Dobs AS: Long-term effects of androgen deprivation therapy in prostate cancer patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 56(6):779–86, 2002.
21. Smith MR: Changes in fat and lean body mass during androgen-deprivation therapy for prostate cancer. *Urology* 63(4):742–5, 2004.
22. Herbert CA, Trigg TE: Applications of GnRH in the control and management of fertility in female animals. *Anim Reprod Sci* 88(1–2):141–53, 2005.
23. Lessey BA: Medical management of endometriosis and infertility. *Fertil Steril* 73(6):1089–96, 2000.
24. Wei A, Fascetti AJ, Kim K, Ramsey JJ: Post-castration variations in weight gain in a cohort of young adult male cats. *J Nutr Sci* 3:e37, 2014.
25. Nguyen PG, Dumon HJ, Siliart BS, Martin LJ, Sergheraert R, Biourge VC: Effects of dietary fat and energy on body weight and composition after gonadectomy in cats. *Am J Vet Res* 65(12):1708–13, 2004.
26. Jiang JMY, Sacco SM, Ward WE: Ovariectomy-Induced Hyperphagia Does Not Modulate Bone Mineral Density or Bone Strength in Rats. *J Nutr* 138(11):2106–10, 2008.
27. Stoch SA, Parker RA, Chen L, Bubley G, Ko YJ, Vincelette A, Greenspan SL: Bone loss in men with prostate cancer treated with gonadotropin-releasing hormone agonists. *J Clin Endocrinol Metab* 86(6):2787–91, 2001.
28. Meldrum DR, Chang RJ, Lu J, Vale W, Rivier J, Judd HL: “medical oophorectomy” using a long-acting gnrh agonist-a possible new approach to the treatment of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1;54 (5):1081–3, 1982.

29. Ohtsuka S, Terakawa N, Shimizu I, Sakata M, Mizutani T, Miyake A, Tanizawa O, Aono T: Studies on GnRH agonist suppression of estrogen production in patients with endometriosis. *Endocrinol Jpn* 36(4):611–9, 1989.
30. Shimizu H, Ohtani K, Kato Y, Tanaka Y, Mori M: Estrogen increases hypothalamic neuropeptide Y (NPY) mRNA expression in ovariectomized obese rat. *Neurosci Lett* 204(1–2):81–4, 1996.
31. Ainslie: Estrogen deficiency causes central leptin insensitivity and increased hypothalamic neuropeptide Y. *Nature* doi: 101038/sjijo0801806, 2001.
32. Litwak SA, Wilson JL, Chen W, Garcia-Rudaz C, Khaksari M, Cowley MA, Enriori PJ: Estradiol prevents fat accumulation and overcomes leptin resistance in female high-fat diet mice. *Endocrinology* 155(11):4447–60, 2014.
33. Matysková R, Zelezná B, Maixnerová J, Koutová D, Haluzík M, Maletínská L: Estradiol supplementation helps overcome central leptin resistance of ovariectomized mice on a high fat diet. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Métabolisme* 42(3):182–6, 2010.
34. Yamasaki H, Douchi T, Yamamoto S, Oki T, Kuwahata R, Nagata Y: Body fat distribution and body composition during GnRH agonist therapy. *Obstet Gynecol* 97(3):338–42, 2001.
35. Boxer RS, Kenny AM, Dowsett R, Taxel P: The effect of 6 months of androgen deprivation therapy on muscle and fat mass in older men with localized prostate cancer. *Aging Male* 8 (3–4):207–12, 2005.
36. Park HK, Lee HS, Ko JH, Hwang IT, Lim JS, Hwang JS: The effect of gonadotrophin-releasing hormone agonist treatment over 3 years on bone mineral density and body composition in girls with central precocious puberty. *Clin Endocrinol (Oxf)* 77(5):743–8, 2012.
37. Skinner DC, Albertson AJ, Navratil A, Smith A, Mignot M, Talbott H, Scanlan BN: GnRH Effects Outside the Hypothalamo-Pituitary-Reproductive Axis. *J Neuroendocrinol* 21(4):282–92, 2009.
38. Kim EY: Long-term effects of gonadotropin-releasing hormone analogs in girls with central precocious puberty. *Korean J Pediatr* 58(1):1–7, 2015.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
39. Theander-Carrillo C, Wiedmer P, Cettour-Rose P, Nogueiras R, Perez-Tilve D, Pfluger P, Castaneda TR, Muzzin P, Schürmann A, Szanto I, Tschöp MH, Rohner JF: Ghrelin action in the brain controls adipocyte metabolism. *J Clin Invest* 116(7):1983–93, 2006.
 40. Pedersen SB, Børglum JD, Møller-Pedersen T, Richelsen B: Effects of in vivo estrogen treatment on adipose tissue metabolism and nuclear estrogen receptor binding in isolated rat adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 85(1–2):13–9, 1992.
 41. Homma H, Kurachi H, Nishio Y, Takeda T, Yamamoto T, Adachi K, Morishige K, Ohmichi M, Matsuzawa, Murata Y: Estrogen Suppresses Transcription of Lipoprotein Lipase Gene. Existence of A Unique Estrogen Response Element On The Lipoprotein Lipase Promoter. *J Biol Chem* 275(15):11404–11, 2009.
 42. Pedersen SB, Børglum JD, Eriksen EF, Richelsen B: Nuclear estradiol binding in rat adipocytes. Regional variations and regulatory influences of hormones. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res* 1093(1):80–6, 1991.