



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Efecto de la obesidad sobre el ambiente intrauterino y la
gestación: mecanismos involucrados**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires en el área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Lic. María Victoria Bazzano

Director de Tesis: Dra. Evelin Mariel Elia.

Consejero de Estudios: Dra. Fabiana Laura Lo Nostro.

Lugar de trabajo: Instituto de Fisiología Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE)-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)-Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Lugar y fecha: Buenos Aires, Mayo de 2019.

Efecto de la obesidad sobre el ambiente intrauterino y la gestación: mecanismos involucrados.

La obesidad es un problema de creciente prevalencia a nivel mundial que impacta negativamente sobre la salud reproductiva femenina, desconociéndose los mecanismos involucrados. El objetivo general del presente fue estudiar si la obesidad afecta el desempeño reproductivo femenino y si el mecanismo a través del cual lo hace involucra alteraciones en el ambiente intrauterino y/o en el proceso de implantación embrionaria. Para ello se utilizó un modelo murino de obesidad. Un grupo de ratas Wistar recibió dieta estándar (grupo control) mientras en un segundo grupo se indujo obesidad por administración de dieta de cafetería (CAF) *ad libitum* durante 60 días (grupo obeso). Al finalizar el protocolo dietario se evaluó el efecto la obesidad sobre el ambiente uterino previamente a que ocurra la concepción, así como también su impacto sobre el desarrollo de la gestación. Se evaluaron los días de gestación (gd): 4.5 (pre-implantación), 5.5 (post-implantación) y 18.5 (gestación tardía).

Se observó que la administración de CAF por 60 días generó obesidad asociada a insulino resistencia. Los animales obesos presentaron menores tasas de fertilidad que los animales control y les llevó más tiempo alcanzar la concepción.

Al evaluar a aquellos animales que alcanzaron la gestación, se encontró que la obesidad materna generó una disparidad en el número de embriones presentes en ambos cuernos uterinos, así como también alteró el espaciamiento entre ellos. El hecho de que esto fue evidenciado tanto en 18.5, 5.5 y 4.5 gd lleva a concluir que la obesidad genera dicha alteración antes de que los embriones se implanten en el útero materno. A fines de estudiar las posibles causas de dichas alteraciones, se evaluaron los principales factores que regulan la distribución embrionaria intrauterina. Se detectó un aumento en los niveles del receptor adrenérgico β_2 , una disminución génica del receptor 3 del ácido lisofosfatídico y un aumento en la actividad contráctil en los úteros de animales obesos en 4.5 gd respecto del grupo control. La obesidad no solo alteró el útero materno sino que produjo alteraciones a nivel embrionario. En el grupo obeso se detectó un retraso en el descenso de los embriones a la cavidad uterina en 4.5 gd; observándose, además, un desfasaje en el desarrollo de los embriones y un aumento de embriones no viables cuando se los comparó con los controles. Al evaluar los fetos (18.5 gd) provenientes de madres obesas se observó que estos presentaron mayor peso corporal que los de madres control.

Por todo lo expuesto, resultó interesante evaluar el ambiente uterino antes de la concepción. Se observó que la obesidad generó insulino resistencia uterina asociada a la disminución de la expresión génica del receptor de insulina y un aumento en la expresión génica del factor 1α inducible por hipoxia. Se sabe que la resistencia a la insulina sistémica altera la capacidad de respuesta uterina y su actividad contráctil, por lo cual en estos animales se evaluó la actividad contráctil uterina espontánea y la expresión uterina del receptor adrenérgico $\beta 2$ (cuya cadena de señalización induce la relajación miometrial). Si bien la actividad contráctil uterina espontánea fue similar en úteros de animales control y obesos, se detectó una disminución tanto en la expresión génica como proteica del $\beta 2AR$ en útero de ratas obesas respecto al grupo control. Estos resultados demuestran que el ambiente uterino se encuentra alterado en las ratas obesas desde antes de que ocurra la concepción.

Por todo lo expuesto, se concluye que la obesidad impacta negativamente sobre el desempeño reproductivo femenino; altera el posicionamiento de los embriones en el útero, afectando de esta manera el proceso implantatorio. Además, encontramos que la respuesta uterina a la insulina se ve alterada por la obesidad a través de mecanismos que implican una disminución de los niveles uterinos del receptor de insulina, así como de la señalización de hipoxia celular mediante $HIF1\alpha$. Por tanto, la modificación del ambiente intrauterino tiene un efecto sobre la salud de la descendencia que fue evidenciada por la macrosomía observada en la prole de las madres obesas. Así, la obesidad condiciona no sólo al individuo obeso sino también al desarrollo de su descendencia, aumentando el riesgo de que ésta última desarrolle un fenotipo obeso en la adultez. De esa manera, el fenotipo obeso parecería perpetuarse dado que los hijos de madres obesas presentarán alteraciones metabólicas en la adultez que transmitirán a las futuras generaciones.

Palabras claves: Obesidad, dieta de cafetería, gestación, implantación embrionaria, actividad contráctil uterina, Receptor adrenérgico $\beta 2$, insulina.

Effect of obesity on the intrauterine environment and gestation: mechanisms involved.

The prevalence of obesity is increasing worldwide and it is related to several reproductive disorders; however, the mechanisms linking them remain unclear. The general objective of the present work was to study whether obesity affects the female reproductive performance and if alterations in the intrauterine environment and/or the process of embryo implantation are part of the mechanisms involved. For that purpose, a murine model of obesity was used. One group of Wistar rats received standard diet (control group) while a second group was also fed with cafeteria diet (CAF) ad libitum for 60 days (obese group). After that, the impact of obesity on the uterine environment was studied before conception and during pregnancy: on gestation day (gd) 4.5 (pre-implantation), 5.5 (post-implantation) and 18.5 (late gestation).

It was observed that the administration of CAF during 60 days induced obesity and insulin resistance in female rats. Obese animals showed lower fertility rates and higher conception times when compared to control animals.

When the pregnancy period was analyzed, it was found that maternal obesity induced a disparity in the number of embryos present in each uterine horn, as well as an alteration in embryo spacing. This disruption was observed on 18.5, 5.5 as well as on 4.5 gd, suggesting that it occurs prior to embryo implantation. In order to evaluate the causes of these alterations, the main factors regulating the intrauterine embryo distribution were studied. On 4.5 gd, higher β 2AR levels and lower receptor 3 of the lysophosphatidic acid levels were detected in uteri from obese rats compared to controls. Moreover, uteri from obese animals showed higher contractile activity compared to the control group.

Furthermore, obesity not only alters the uterine environment on 4.5 gd but it also altered embryo development. Embryos from obese mothers were not in the timely phase of development expected for the pre-implantation period: while in controls all embryos were in the uterine cavity, in the obese group some embryos were still in the oviduct on 4.5 gd. Moreover, a higher percentage of morulae and a lower percentage of blastocysts were detected in the obese group compared to controls. On the other hand, it was found that on 18.5 gd, fetal body weights were higher in the obese progeny than those from controls.

When the uterine environment was evaluated before conception, it was found that obesity induced uterine insulin resistance that was associated to lower insulin receptor gene

expression and higher Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 α gene levels. It is known that systemic insulin resistance alters uterine responsiveness and its contractile activity, so the spontaneous uterine contractile activity was studied. Moreover, the myometrial relaxation inducer: β 2 adrenergic receptor (β 2AR) uterine levels were evaluated. Although obese animals showed no alterations in the spontaneous uterine contractile activity, lower gene and protein β 2AR levels were detected in uteri from obese rats compared to controls. These results show that the uterine environment is altered in obese rats even before conception.

In conclusion, here it is shown that CAF diet induced- obesity impairs the reproductive performance in female rats and alters the implantation process through disrupting the intrauterine embryo positioning process. In addition, we found that the uterine response to insulin is altered by obesity through mechanisms that involve a decrease in the uterine levels of insulin receptor as well as hypoxia/HIF1 α signaling. Moreover, offspring development is altered by maternal obesity since fetal macrosomia was detected in fetuses from obese mothers. Since macrosomia is a risk factor for metabolic and obstetric disorders in adult life, we suggest that obesity is impacting not only on health and reproduction, but it is also impairing offspring's health and reproduction. Therefore, the obese phenotype seems to be perpetuated since offspring from obese mothers will have metabolic alterations in adulthood that they will transmit to future generations.

Keywords: Obesity, cafeteria diet, gestation, embryo implantation, uterine contractile activity, β 2 adrenergic receptor, insulin.

Agradecimientos:

A la Universidad de Buenos Aires y en especial a mi amada Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por haber sido fuente de una educación de excelencia, pública y gratuita. Por brindarme la oportunidad de realizar mi carrera de grado y posgrado, gracias a la cual no sólo me llevo lo aprendido sino el entusiasmo de seguir en el camino de la investigación y todos los colegas y amigos hechos.

A mis profesores, quienes me enseñaron y demostraron el amor por su profesión. Por haberse brindado plenamente y haber compartido con sus alumnos más que el dictado de un curso o materia.

A mi querido Dante Paz, por abrirme las puertas de su laboratorio y enseñarme día a día el amor por la investigación. Por permitirme crecer como estudiante, profesional y persona, y tener siempre una palabra de aliento. Por estar **siempre** al pendiente de su grupo de investigación. Me llevo los miles de recuerdos juntos, sus dichos y moralejas que siempre supieron sacarme una sonrisa y alentarme a continuar a pesar de los avatares de la mesada o de la vida.

A Evelin Elia, por aceptar ser mi directora de tesis y todo lo que eso implicó. Por todo lo que me ha enseñado, dándome la libertad necesaria a la hora del trabajo y confianza para seguir adelante. Por no haber bajado los brazos y haber luchado por la línea de investigación y hacer hasta lo imposible por brindarme los recursos necesarios para desarrollar mi doctorado. Por haberse brindado plenamente como investigadora, directora y amiga.

A Cecilia Cirio, Jimena Frontera, Marilina Raíces, y Ailén Cervino, por las incansables veces que me ayudaron en la mesada y fuera de ésta. Por haber sido desde el primer día tan afectuosos y ser ejemplo de pasión por la investigación científica. Por ser mis amigas y siempre brindarme todo su apoyo y cariño.

A Gisela Sarrible, por brindarnos siempre su alegría y ganas de trabajo. Por todos los mates, música y experimentos compartidos. Por ayudarme una y mil veces y principalmente por brindarme su amistad.

A los miembros de mi comisión de seguimiento de tesis, Gustavo Martinez y Juan Carlos Calvo por sus valiosos aportes a mi trabajo.

Al Instituto de Fisiología Biología Molecular y Neurociencias por habernos apoyado como grupo de investigación. En especial a **José Clemente** por toda la ayuda brindada siempre con buena predisposición, a **Roberto Fernandez** por su ayuda en el confocal y a **Daniela de Luca** quien me brindó su cariño y respondió mis consultas siempre con tanta calidez.

Al Bioterio Central de Ciudad Universitaria, en especial a **Diego Massara y Martín Viale**, por la buena predisposición a la hora del trabajo y toda la ayuda recibida.

A los laboratorios vecinos y ex vecinos, por brindarme su ayuda con tanta calidez. En especial a **Elisa Cebral, Paula Vissio, Paula Di Yorio, Daniela Perez Sirkin, Daniel Medesani, Fabiana Lo Nostro, Gladis Hermida y Daniel Hochbaum**.

A Martín Berón de Astrada por su ayuda en los experimentos de contracción y a **Nora Martínez** por su ayuda en los experimentos de incorporación de glucosa. A ambos, por haber sido siempre tan cálidos y atentos.

A Luigi de Voto y a todo su laboratorio que me acogieron con tanto cariño en mi pasantía por Chile y me hicieron sentir como en casa.

A TODOS... por enseñarme la importancia del trabajo en equipo, por brindarme día a día la calidez de su compañía y permitirme compartir la vida con uds.

A mis amigas Carlita, Agus, Cata, Astrid y Chechu con quien junto empecé la carrera de biología y a pesar de haber tomado caminos distintos, siempre nos reúne la alegría del sabernos amigas. Por haberme permitido compartir sus vidas y por todo su apoyo y cariño recibido.

A mi familia, por estar siempre a mi lado a pesar de la distancia; ser incondicionales y brindarme tanto amor.

A Nyscha, por brindarme tanto cariño y apoyo; por quererme como a una hija.

A mi abuela, por haberme incentivado con el estudio y enseñarme a ser una persona de valores. Por haberme cuidado desde pequeña y aún seguir haciéndolo.

A Romi, por ser quien me acompañó en los primeros años en Buenos Aires y aún sigue dándome todo su apoyo. Por ser la mejor hermana que la vida pudo darme. **A Diego**, por brindarme todo su afecto y ayuda y ambos ser ejemplo de seguir día a día luchando por lo que los apasiona. **A Lucas**, quien su sonrisa lo es todo!

A Iván, por haber compartido conmigo los nervios de un examen, la locura de la tesis y la alegría de los logros realizados. Por estar siempre a mi lado y brindarme todo tu amor. Por ser el amor de mi vida.

A quienes me dieron la vida y día a día me brindan su ejemplo de trabajo y amor por la familia. **A mi papá** por ser quien desde pequeña me estimuló el amor a la biología y **a mi mamá** por estar siempre al pie del cañón, defendiendo, amando y cuidando a sus hijas.

El contenido de esta tesis ha sido parcialmente publicado en:

Bazzano MV, Torelli C, Pustovrh MC, Paz DA y Elia EM. 2015. **“Obesity Induced by Cafeteria Diet Disrupts Fertility in the Rat by Affecting Multiple Ovarian Targets.”***Reproductive Biomedicine Online* 31 (5):655–67. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.08.004>.

Bazzano MV, Paz DA y Elia EM. 2017. **“Obesity Alters the Ovarian Glucidic Homeostasis Disrupting the Reproductive Outcome of Female Rats.”***Journal of Nutritional Biochemistry* 42: 194–202. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.01.003>.

Bazzano MV, Sarrible GB, Martinez N, Berón de Astrada M y Elia EM. 2018. **“Obesity Alters the Uterine Environment before Pregnancy.”***The Journal of Nutritional Biochemistry* 62: 181–91. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.09.009>.

Abreviaturas:

ADNc: ADN copia.

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico.

AR: Receptores adrenérgicos

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

ART: Técnicas de reproducción asistida

AUC: Área bajo la curva

α AR: Receptor adrenérgico de tipo alfa

β AR: Receptor adrenérgico de tipo beta

BI: Blastocite

CAF: Dieta de cafetería

CGTs: Células gigantes de trofoblasto

CL: Cuerpo lúteo

COX-2: Ciclooxygenasa tipo 2

C1: Cuerno uterino 1, aquel que presentó el mayor número de embriones/ SI/ UFP

C2: Cuerno uterino 2, aquel que presentó el menor número de embriones/ SI/ UFP

DIO: Modelos de obesidad inducida por la dieta

DM2: Diabetes mellitus tipo 2

dNTP: Desoxirribonucleótidos trifosfato

E: Estrógenos

E2: Estradiol

F: Folículos

FSH: Hormona folículo estimulante

GLUT: Transportadores de glucosa

GTT: Prueba de tolerancia a la glucosa

hCG: Gonadotropina coriónica humana

HFD: Dietas con alto contenido graso

HIF-1 α : Factor de transcripción inducible por hipoxia

IMC: Índice de masa corporal

IMP: Implantación

InsR: Receptor de insulina

IR: Insulino resistencia

ITT: Prueba de tolerancia a insulina

KiTT: Constante de velocidad del metabolismo de glucosa.

LH: Hormona luteinizante

LPA₃: Receptor 3 del ácido lisofosfatídico

MCI: Macizo celular interno

NZO: Ratones obesos Nueva Zelanda

OMS: Organización Mundial de la Salud

P: Progestágenos

PCNA: Antígeno nuclear de células en proliferación

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PG: Prostaglandina

PKA: Proteína kinasa A

PPAR: Receptores nucleares activados por proliferadores peroxisomales

PPARY: Receptor nuclear activado por proliferadores peroxisomales de tipo gamma

P4: Progesterona

qPCR: PCR en tiempo real

RT: Retrotranscripción

TE: Trofoectodermo

TM: Trofoectodermo mural

S.E.M: Error estándar de la media estadística

TP: Trofoectodermo Polar

UFP: Unidades fetoplacentarias

ZP: Zona pelúcida

Índice

| | |
|---|----|
| Introducción | 1 |
| 1 Obesidad | 2 |
| 1.1 Definición | 2 |
| 1.2 Epidemiología..... | 2 |
| 1.3 Factores predisponentes al desarrollo de obesidad | 5 |
| 1.4 Modelos experimentales de obesidad | 5 |
| 1.4.1 Modelos de obesidad inducida por ablación. | 6 |
| 1.4.2 Modelos genéticos de obesidad..... | 7 |
| 1.4.3 Modelos murinos de obesidad inducida por la dieta..... | 8 |
| 1.5 Disfunciones asociadas al desarrollo de obesidad | 9 |
| 1.6 Efecto de la obesidad sobre la reproducción femenina | 10 |
| 2 El tracto reproductor femenino | 13 |
| 2.1 Los ovarios..... | 13 |
| 2.2 Los oviductos..... | 14 |
| 2.3 El útero | 15 |
| 2.3.1 Anatomía e histología..... | 15 |
| 2.3.2 Funcionalidad uterina..... | 18 |
| 3 Ciclos reproductivos | 20 |
| 3.1 El ciclo menstrual | 21 |
| 3.2 El ciclo estral..... | 23 |
| 4 Gestación. | 24 |
| 4.1 Pre-implantación | 25 |
| 4.1.1 Desarrollo embrionario | 25 |
| 4.1.2 Transporte embrionario intrauterino..... | 26 |
| 4.2 Implantación | 29 |
| 4.3 Post-implantación | 31 |
| 4.3.1 Desarrollo embrionario | 31 |
| 4.3.2 Establecimiento de la interfase materno-fetal | 31 |
| Hipótesis y Objetivos..... | 34 |
| Materiales y Métodos | 36 |

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Animales..... | 37 |
| 2 | Establecimiento del modelo experimental de obesidad inducida por la dieta | 37 |
| 2.1 | Evaluación de la ingesta alimentaria..... | 38 |
| 2.2 | Evaluación del peso corporal y circunferencia abdominal..... | 38 |
| 2.3 | Evaluación del ciclo estral | 38 |
| 3 | Diseño Experimental..... | 38 |
| 4 | Obtención de muestras para el estudio del efecto de la obesidad sobre el ambiente uterino pre-concepcional | 39 |
| 5 | Análisis del impacto de la obesidad sobre el desarrollo de la gestación..... | 39 |
| 5.1 | Apareos | 39 |
| 5.2 | Evaluación del rendimiento reproductivo..... | 40 |
| 5.3 | Monitoreo de la gestación avanzada | 40 |
| 5.4 | Monitoreo de la gestación durante la post-implantación temprana | 40 |
| 5.5 | Monitoreo de la gestación previamente a que ocurra la implantación embrionaria..... | 41 |
| 5.5.1 | Evaluación de los embriones..... | 41 |
| 5.5.2 | Evaluación de los úteros..... | 42 |
| 6 | Anestesia, analgesia y eutanasia..... | 42 |
| 7 | Determinaciones experimentales..... | 42 |
| 7.1 | Características metabólicas de los animales..... | 42 |
| 7.1.1 | Prueba de tolerancia a la glucosa..... | 42 |
| 7.1.2 | Prueba de tolerancia a la insulina | 42 |
| 7.2 | Perfil hormonal | 43 |
| 7.2.1 | Estradiol..... | 43 |
| 7.2.2 | Progesterona | 43 |
| 7.3 | Western Blots..... | 44 |
| 7.4 | Análisis de la expresión génica..... | 45 |
| 7.4.1 | Extracción de ARN | 45 |
| 7.4.2 | Retrotranscripción..... | 45 |
| 7.4.3 | Reacción en cadena de la polimerasa | 45 |
| 7.4.4 | PCR en tiempo real..... | 47 |
| 7.5 | Procesamiento del tejido uterino para la realización de técnicas histológicas | 48 |
| 7.5.1 | Coloración Tricrómico de Masson..... | 48 |
| 7.5.2 | Estudio de la histología uterina..... | 48 |
| 7.5.3 | Inmunofluorescencia..... | 49 |

| | | |
|-------|---|----|
| 7.5.4 | Inmunohistoquímica contra el antígeno nuclear de células en proliferación | 50 |
| 7.6 | Evaluación de la incorporación de glucosa por parte de los úteros | 50 |
| 7.7 | Análisis de la actividad contráctil uterina | 51 |
| 8 | Análisis estadístico | 52 |
| | Resultados | 53 |
| | <i>Capítulo I: Establecimiento del modelo experimental de obesidad</i> | 54 |
| 1 | La administración de CAF por 60 días genera hiperfagia voluntaria | 54 |
| 2 | La administración de CAF por 60 días genera obesidad | 55 |
| 3 | La obesidad inducida por CAF se asocia con intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina | 56 |
| 3.1 | Curva de tolerancia a la glucosa..... | 56 |
| 3.2 | Curva de resistencia a insulina | 57 |
| | Conclusión Parcial I: | 59 |
| | <i>Capítulo II: Impacto de la obesidad pre-concepcional sobre el desarrollo de la gestación</i> | 60 |
| 1 | La obesidad disminuye las tasas de fertilidad y retrasa la concepción | 60 |
| 2 | La obesidad pre-concepcional incrementa la ganancia de peso corporal materno durante la gestación..... | 61 |
| 3 | La obesidad pre-concepcional genera un incremento en los niveles séricos de Estradiol en gestación avanzada | 62 |
| 4 | La obesidad materna pre-concepcional genera macrosomía fetal | 62 |
| 5 | La obesidad materna pre-concepcional genera una disparidad en el número de fetos presentes en ambos cuernos uterinos..... | 63 |
| 5.1 | La disparidad en el número de fetos observada en gestantes obesas no es consecuencia de pérdidas post-implantatorias..... | 66 |
| 5.2 | La disparidad en el número de fetos detectada en ratas obesas no se debe a que ocurra ovulación diferencial entre ambos ovarios..... | 66 |
| 6 | La obesidad materna pre-concepcional genera una disparidad en el número de embriones presentes en ambos cuernos uterinos antes de que se produzca la implantación.. | 67 |
| 7 | El espaciamiento embrionario intrauterino se ve alterado como consecuencia de la obesidad materna pre-concepcional | 70 |
| 8 | La llegada de los embriones al útero materno se ve retrasada como consecuencia de la obesidad materna pre-concepcional. | 71 |
| 9 | La disparidad en el número de embriones observada en ratas obesas es consecuencia de un aumento en el número de embriones no viables; observándose además un desfasaje en el desarrollo embrionario. | 74 |
| 10 | La expresión uterina del receptor adrenérgico β_2 se ve incrementada durante la pre-implantación como consecuencia de la obesidad materna pre-concepcional. | 76 |

| | | |
|-----|--|-----|
| 11 | La obesidad pre-concepcional altera la expresión génica del receptor 3 del ácido lisofosfatidico en úteros preimplantatorios..... | 79 |
| 12 | La obesidad materna pre-concepcional altera la respuesta y la actividad contráctil del útero preimplantatorio | 80 |
| 13 | La expresión uterina del receptor nuclear activado por proliferadores peroxisomales gamma se ve disminuida durante, la pre-implantación, como consecuencia de la obesidad pre-concepcional. | 86 |
| | Conclusiones parciales II | 87 |
| | <i>CAPÍTULO III: ESTUDIO DEL EFECTO DE LA OBESIDAD SOBRE EL AMBIENTE UTERINO PRE-CONCEPCIONAL</i> | 88 |
| 1 | El ambiente uterino se ve alterado como consecuencia de la obesidad antes de que ocurra la concepción. | 88 |
| 1.1 | La obesidad induce resistencia a insulina a nivel uterino por mecanismos que involucran la disminución en la expresión génica del receptor de insulina. | 89 |
| 1.2 | La expresión génica del factor 1 α inducible por hipoxia se ve estimulada a nivel uterino como consecuencia de la obesidad..... | 90 |
| 1.3 | La expresión proteica del receptor nuclear activado por proliferadores peroxisomales gamma no se ve alterada en el útero como consecuencia de la obesidad. | 91 |
| 2 | La obesidad provoca un aumento de la proliferación celular a nivel uterino. | 92 |
| 3 | La expresión uterina del receptor adrenérgico β 2 se ve disminuida en animales pre-gestantes como consecuencia de la obesidad. | 96 |
| 4 | La obesidad no modifica la expresión uterina del receptor 3 del ácido lisofosfatidico ... | 99 |
| 5 | La obesidad no modifica la actividad contráctil uterina espontánea antes de que se produzca la concepción..... | 99 |
| 6 | La obesidad genera, antes de la concepción, una menor sensibilidad uterina a Salbutamol, agonista selectivo del receptor adrenérgico β 2..... | 100 |
| | Conclusión parcial III: | 104 |
| | Discusión | 105 |
| | Conclusión | 116 |
| | Bibliografía | 119 |

Introducción

1 Obesidad

1.1 Definición

La obesidad es una enfermedad crónica de etiología multifactorial generada por una ingesta calórica que supera el gasto energético (Hill *et al.* 2013), siendo su principal característica la acumulación de grasas que se traduce en un aumento de peso corporal (Barbani *et al.* 2002).

Si bien existen diferentes formas de medir la cantidad de grasa corporal, el índice de masa corporal (IMC) es sin duda el marcador más ampliamente utilizado debido a su bajo costo, versatilidad y facilidad de cálculo (Hruby *et al.* 2016). El IMC se calcula dividiendo el peso de una persona, expresada en kilos, por el cuadrado de su talla, expresada en metros (kg/m^2). La Organización Mundial de la Salud (OMS) establece que una persona adulta presenta sobrepeso cuando su IMC es igual o superior a 25 y es considerada obesa cuando el IMC es igual o superior a 30 (World Health Organization 2018). No obstante, en la clínica se toma en cuenta -además del IMC- la raza, etnia, masa magra, edad, sexo y otros factores que pueden afectar el IMC y no son contemplados al calcularlo (Franzosi 2006).

Debido a que la obesidad no es un desorden que afecte únicamente a personas adultas, la OMS ha definido que un niño presenta sobrepeso u obesidad si su IMC es mayor o igual a una, dos o tres desviaciones estándar por encima de la media poblacional para su sexo y su edad (World Health Organization 2018).

1.2 Epidemiología

La obesidad representa un serio problema epidemiológico a nivel mundial, debido a que su prevalencia se ha incrementado alcanzando niveles alarmantes (Elia *et al.* 2015; Meldrum *et al.* 2017); es por ello que combatirla constituye uno de los mayores desafíos en torno a la salud pública del siglo XXI. La OMS declaró a la obesidad como la más importante de las enfermedades crónicas no transmisibles, alcanzado proporciones pandémicas principalmente en la sociedad occidental, que se produce como consecuencia en la modificación de los estilos de vida y la automatización (World Health Organization 2018). Los cambios en la alimentación (aumento en la ingesta de las comidas ultra procesadas y de azúcares) junto con el incremento del sedentarismo han favorecido el aumento de esta pandemia (Popkin 2017).

Reportes de la OMS han indicado que desde 1975 la prevalencia de obesidad se ha triplicado a nivel mundial, observándose en 2016 que 1900 millones de adultos (39%) presentaban sobrepeso y más de 650 millones (13%) eran obesos; observándose además que

las mujeres son más propensas a desarrollar obesidad que los hombres, dado que el 70% de las mujeres y el 40% de los hombres la padecen (Sibuyi *et al.* 2018; World Health Organization 2018).

Clásicamente, la obesidad ha presentado una mayor prevalencia en rangos poblacionales etarios más avanzados; sin embargo, su incremento entre la población más joven ha sido drástico en las últimas décadas (Frederick *et. al* 2013). En relación a ello, la OMS reportó que en 2016 había, a nivel mundial, más de 340 millones de niños y adolescentes (de 5 a 19 años) con sobrepeso y obesidad y que 41 millones de niños menores de cinco años tenían sobrepeso o eran obesos (World Health Organization 2018).

Proyecciones realizadas a nivel mundial estiman que para el año 2030, casi el 40% de la población mundial tendrá sobrepeso y una de cada cinco personas será obesa (Kelly *et al.* 2008). Si bien no existen proyecciones realizadas más recientemente, cada día nos acercamos más a los valores predichos por dicha proyección, observándose que esta enfermedad afecta tanto a países desarrollados como en vías de desarrollo (Anoop *et al.* 2008; Meldrum *et al.* 2017).

Si se analiza a nivel mundial, más del 50% de la población mayor de 20 años con un IMC superior a 30 (Figura 1), se encuentra representada en tan sólo 10 países: Estados Unidos, China, India, Rusia, Brasil, México, Egipto, Alemania, Pakistán e Indonesia (ordenados según el número de individuos obesos que presentan) (Ng *et al.* 2014). Estados Unidos presenta el 13% de los individuos obesos del mundo, mientras que China e India juntos suman el 15% (Ng *et al.* 2014). Estos datos ponen de manifiesto que el desarrollo de la obesidad parece verse favorecido por la dieta occidental. Además, se ha descrito que, en los últimos 33 años, en ningún país se ha observado disminución en la prevalencia de obesidad (Ng *et al.* 2014).

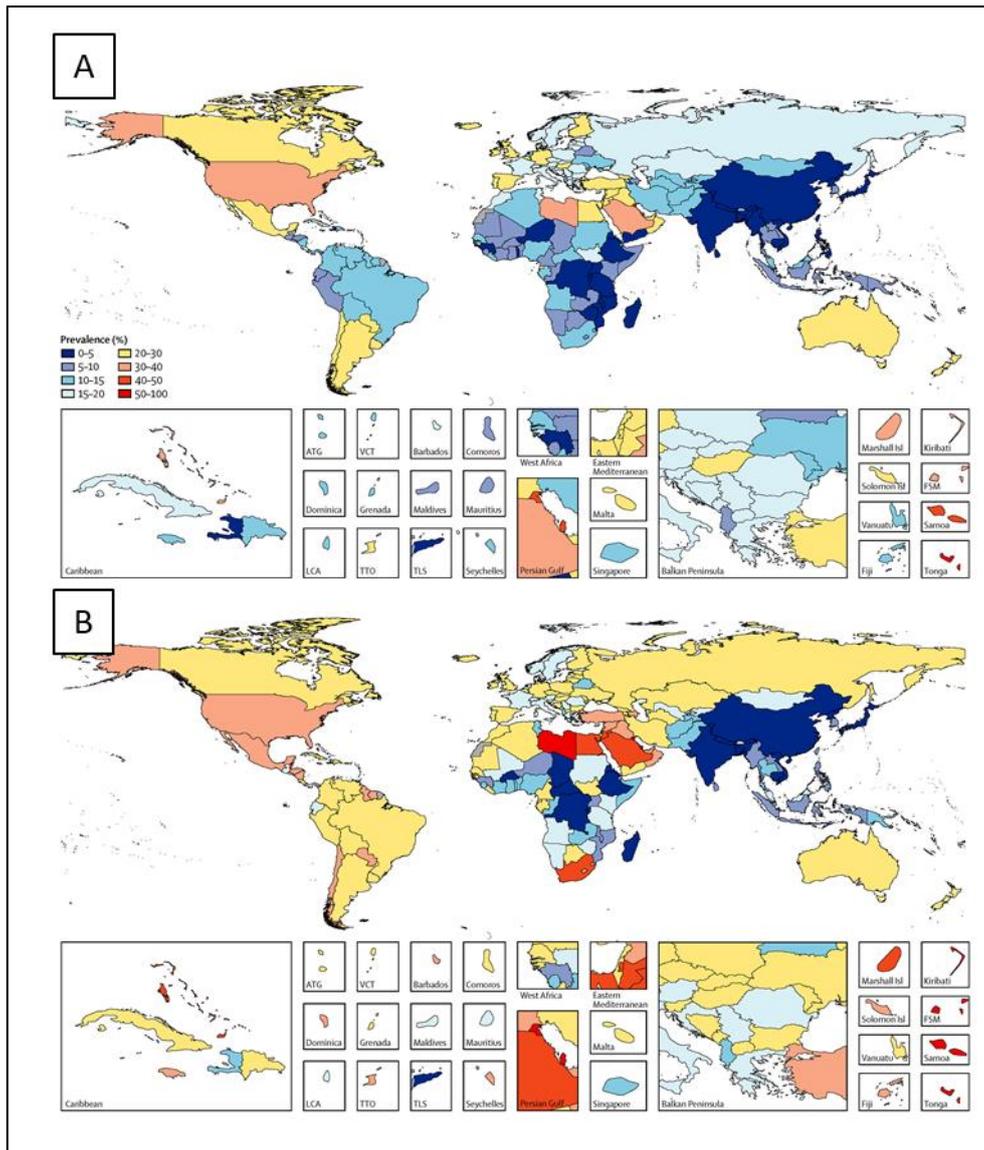


Figura 1: Prevalencia de obesidad (IMC \geq 30 kg/m²) a nivel mundial en el año 2013, estandarizada por edad y sexo: A) Prevalencia en hombres de mayores a 20 años, B) Prevalencia en mujeres mayores de 20 años. La escala de colores alcanza desde el azul, que representa la menor prevalencia, hasta el rojo, que grafica la mayor incidencia. *Adaptado de: "Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980 – 2013 : a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013" (Ng et al. 2014).*

Según datos proporcionados por el Ministerio de Salud de la República Argentina, en nuestro país existió un aumento significativo de la prevalencia de obesidad entre 2005 y 2013. A nivel nacional, la prevalencia de la obesidad en 2013 fue de 20,8% mientras en 2005 que fue de 14,6%, representando, entonces un incremento del 42,5%. La prevalencia de sobrepeso y obesidad en Argentina, en 2013, fue mayor en hombres que en mujeres (sobrepeso: 66.2% hombres vs 50.1 mujeres, obesidad: 22.9% hombres y 18.8% en mujeres), contrariamente a la tendencias observadas a nivel mundial.

Las provincias que evidenciaron mayor prevalencia de obesidad que el promedio nacional fueron: La Rioja (27,9%), Chubut (24,8%) y Santa Fe (24,5%); en contraposición, la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (16%) presentó valores inferiores al promedio nacional.

Respecto al nivel educativo, se evidenció mayor prevalencia de obesidad en los niveles de instrucción más bajos: hasta primario incompleto y hasta secundario incompleto, en los que la prevalencia fue de 28,1% y 24,5% respectivamente; mientras que en el nivel educativo más alto ésta fue del 17%(Ministerio de Salud de la Nación. 2013).

1.3 Factores predisponentes al desarrollo de obesidad

Múltiples son los factores que contribuyen al desarrollo de esta patología, entre los que se destacan: la dieta, el descenso en la frecuencia de actividad física (Ewing *et al.* 2008); así como también factores subyacentes más complejos como son, por ejemplo, los genéticos, fisiológicos, psicológicos, sociales, económicos y educativos (Meldrum *et al.* 2017). Respecto de la dieta se sabe se ha producido en los últimos años un aumento en la ingesta de alimentos hipercalóricos y ricos en grasa, sal y azúcares pero pobres en vitaminas, minerales y otros micronutrientes (Roberto *et al.* 2015), pudiendo esto contribuir con el crecimiento en la prevalencia de la patología.

En la mayoría de las circunstancias la obesidad y sus precursores energéticos relacionados son normalmente rasgos multifactoriales o poligénicos, que resultan de la acción combinada de muchos genes e interacciones ambientales. Por tanto, si bien puede existir una predisposición genética a desarrollar obesidad, ésta es potenciada por factores ambientales (Kleinert *et al.* 2018).

Todos los factores mencionados contribuyen al establecimiento de un ambiente obesogénico (Meldrum *et al.*2017) en el que se produce un desequilibrio energético en el que las calorías consumidas superan a las gastadas (Hill *et al.* 2013).

1.4 Modelos experimentales de obesidad

Históricamente, han sido varios los abordajes utilizados a fin de estudiar el efecto de la obesidad sobre los diferentes sistemas. Los modelos animales han contribuido de manera fundamental a la comprensión de los procesos básicos que regulan el equilibrio energético, permitiendo sentar las bases fisiológicas y genéticas de la obesidad (Speakman *et al.* 2008). Estos modelos han sido diversos, desde moscas (*Drosophila*), peces (*Zebrafish*) y nematodos (*Caenorhabditis elegans*) hasta primates no humanos, pasando por cerdos, perros y roedores (Kleinert *et al.* 2018).

Si bien cada modelo presenta ventajas y desventajas al momento de ser comparados con la patología humana, uno de los modelos más ampliamente utilizados es el de roedores. Además de las ventajas típicas que presentan los roedores como modelo animal de estudio, estos desarrollan obesidad asociada con resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, diabetes y/o trastornos lipídicos, como frecuentemente sucede en los humanos (Kleinert *et al.* 2018).

1.4.1 Modelos de obesidad inducida por ablación.

La relación entre ingesta, saciedad y balance energético resulta esencial en el desarrollo de obesidad. Los primeros modelos de obesidad se centraron en el estudio de estas relaciones, mediadas todas ellas por el sistema neuroendocrino e integrado por el sistema nervioso central principalmente a nivel hipotalámico, lóbulo temporal y amígdala (Flier 2004; Lutz *et al.* 2013). Es por ello que en las primeras investigaciones examinaron los efectos de ablaciones realizadas en diferentes regiones del hipotálamo (Kleinert *et al.* 2018), provocando así una desregulación en el equilibrio energético de los animales y, consecuentemente, obesidad (Mitchel *et al.* 1977, King 2006). Estas lesiones pueden realizarse por métodos físicos (procedimientos quirúrgicos, electrocoagulación, lesiones electrolíticas o de radiofrecuencia), a través de la administración de diversos agentes químicos tales como la colchicina (droga que altera el citoesqueleto) o mediante la inyección de toxinas neuronales como el ácido kainico, el ácido ibotenico, la mostaza de bipiperidina, la tioglucosa de oro, el glutamato monosódico, etc. (Bray *et al.* 1979; Flier 2004; Speakman *et al.* 2008).

El uso de estos modelos experimentales condujeron al reconocimiento del hipotálamo como un área clave del cerebro con respecto a la influencia del metabolismo, permitieron establecer al hipotálamo ventromedial como el centro de saciedad y al hipotálamo lateral como el centro del apetito (King 2006).

Si bien estos modelos han brindado gran parte del conocimiento actual sobre los mecanismos neuroendocrinos asociados a la obesidad, el posterior descubrimiento de numerosas moléculas con efectos orexígenos o anorexígenos y de técnicas genéticas y moleculares llevó a limitar su uso dado que las lesiones en áreas cerebrales son alteraciones tan profundas que podrían afectar numerosas vías de regulación y no exclusivamente la vía de interés.

1.4.2 Modelos genéticos de obesidad

Modelos de obesidad de origen monogénico

La obesidad, en algunos casos, es consecuencia de mutaciones que afectan a un único gen (obesidad de origen monogénico) (Lutz *et al.* 2013).

Casos clásicos de mutaciones espontáneas que generan la pérdida de función de un único gen y generan obesidad son los ratones *ob/ob* (Ingalls *et al.* 1950; Zhang *et al.* 1994), *db/db* (Herberg y Coleman 1978) y la rata Zucker obesa (*fa/fa*) (Nilsson *et al.* 2012; Zucker *et al.* 1961). Los ratones *ob/ob* presentan la supresión de un único par de bases, alterándose la producción de leptina (Zhang *et al.* 1994), al igual que las ratas *fa/fa*, y desarrollando obesidad.

Por todo lo expuesto, estos modelos representan herramientas centrales en la investigación de fármacos (Kleinert *et al.* 2018). Sin embargo, muchas veces no representan la realidad en cuanto a la complejidad génica que presenta la obesidad, en la que pueden estar afectados más de 100 genes (Locke *et al.* 2015). Debido a esta limitación, se han generado modelos poligénicos de obesidad.

Modelos de obesidad de origen poligénico

El número creciente de loci genéticos que se han asociado con la obesidad enfatiza el hecho que la obesidad humana es generalmente una enfermedad poligénica con un alto grado de heterogeneidad interindividual (Kleinert *et al.* 2018).

En estos modelos, la obesidad se produce de manera espontánea o aumenta la susceptibilidad de los animales a padecer obesidad cuando varían las condiciones ambientales tales como la disponibilidad y composición del alimento, la reducción de actividad física, etc. Es por ello, que estos modelos resultan más utilizados en la actualidad; permiten evaluar las interacciones de la susceptibilidad genética con variables dietéticas, ambientales y metabólicas, aunque su interpretación resulta extremadamente compleja.

Entre los principales modelos de obesidad de etiología poligénica se incluyen los ratones obesos Nueva Zelanda (NZO) y C57BL6 / J, ratas Sprague Dawley y Osborne-Mendel (Kleinert *et al.* 2018).

Los NZO son una cepa de ratones que desarrolla obesidad y diabetes mellitus tipo 2 (DM2). En ellos, la adiposidad es impulsada por una hiperfagia moderada, un gasto energético reducido y una actividad voluntaria reducida. Además, presentan una desregulación en la señalización de leptina y trastornos glucémicos relacionados con defectos pancreáticos y hepáticos (Herberg *et al.* 1977).

Los Ratones C57BL6 / J son una cepa de ratones propensa a desarrollar obesidad inducida por hiperfagia cuando se colocan en un entorno obesogénico (dietas altas en grasa:

HFD, por sus siglas en inglés); sin embargo, varios grupos han observado heterogeneidad en la respuesta de ratones C57BL6 / J a una HFD ya que no siempre se observa aumento de peso corporal (Kleinert *et al.* 2018).

Por su lado, las ratas Sprague Dawley presentan hiperinsulinemia e hiperleptinemia y desarrollan rápidamente obesidad cuando se los alimenta con HFD (Clegg *et al.* 2005).

Las ratas Osborne-Mendel son portadoras de un defecto poligenético que las hace susceptibles de padecer obesidad inducida por la dieta. Presentan un incremento de peso corporal proporcional al contenido de lípidos de la dieta, alcanzando un máximo cuando se administran dietas con un 60% del contenido calórico de origen lipídico (Kleinert *et al.* 2018).

Todos estos modelos han contribuido significativamente en la comprensión de las anomalías genéticas que controlan la homeostasis energética, sin embargo, debido al impacto de las variables ambientales sobre la composición corporal, no es posible, la identificación directa de los genes responsables del desarrollo de obesidad.

1.4.3 Modelos murinos de obesidad inducida por la dieta

Los modelos de obesidad inducida por la dieta (DIO) presentan características más parecidas a los humanos, donde la obesidad es de origen multifactorial e incluye el exceso de ingesta calórica (Nilsson *et al.* 2012).

La dieta moderna, especialmente la occidental, contiene altos niveles de grasas y carbohidratos como fructosa y sacarosa. En roedores existen dos formas de DIO, una es producto de la administración de dietas HFD y la otra es consecuencia de la administración de dieta de cafetería (CAF).

En un procedimiento típico donde se implementa HFD, las ratas o los ratones tienen acceso irrestricto a alimentos densos en calorías y altamente enriquecidos en grasas. Así se genera así un intercambio entre las calorías derivadas de carbohidratos por calorías derivadas de grasas cuando se las compara con dietas control (Buettner *et al.* 2006). En estas dietas, el porcentaje de calorías provenientes de grasas puede variar entre 40% y 60%, como así también el origen de las grasas (manteca, aceite de oliva, aceite de coco o aceite de pescado) y el tipo de grasas (saturadas, monoinsaturadas o poliinsaturadas); lo que genera diversos fenotipos de obesidad (Buettner *et al.* 2006).

Debido al excesivo porcentaje de grasas presentes en estas dietas, se considera que este tipo de dieta no refleja muy precisamente el comportamiento alimentario característicos de los humanos obesos (Vadiveloo *et al.* 2014; Kleinert *et al.* 2018).

Por otro lado, este tipo de dietas ha presentado problemas en su implementación dependiendo del tipo de cepa de roedores utilizados (Leibowitz *et al.* 2005; West *et al.* 1992). Por ejemplo, aproximadamente dos tercios de ratas Sprague-Dawley a las que se les administra esta dieta desarrollan resistencia a la misma pero no obesidad (Levin *et al.* 1997; Levin *et al.* 1998). En otras cepas de roedores la resistencia es aún mayor, mostrando incluso una reducción de la ingesta de alimento respecto a los controles (Hambly *et al.* 2005).

A partir de todo lo expuesto hasta aquí, surgió la necesidad de desarrollar otros modelos experimentales que reflejen con mayor precisión la patología humana. Así surgió la dieta CAF (Sclafani y Springer 1976; Akyol *et al.* 2009), modelo en el que los animales tienen acceso libre a agua y a alimento estándar mientras se les ofrece, conjuntamente, alimentos altamente palatables, energéticamente densos y poco saludables.

Ha sido ampliamente demostrado que CAF promueve la hiperfagia voluntaria, resultando en una rápida ganancia de peso (Heyne *et al.* 2009; Morris *et al.* 2008; Sampey *et al.* 2011; Shafat *et al.* 2009). Además de reflejar la ingesta por placer, consistente con la hiperfagia voluntaria característica de la obesidad en humanos, CAF reproduce las alteraciones neuronales que subyacen a los comportamientos alimentarios asociados con algunas formas de obesidad humana (Johnson y Kenny 2010). Es por ello que, actualmente, CAF es considerado un modelo de obesidad humana más robusto (Sampey *et al.* 2011).

Este modelo ha sido implementado de manera exitosa en nuestro laboratorio (Bazzano *et al.* 2015; Bazzano *et al.* 2017; Bazzano *et al.* 2018). En estos trabajos se demostró que la ingesta de CAF por 60 días produce, en ratas hembras Wistar, el desarrollo de obesidad asociado a hiperglucemia sin alterar los niveles séricos de colesterol y triglicéridos (Bazzano *et al.* 2015). Además, CAF genera alteraciones del ciclo estral y de la función ovárica y una reducción en la reserva folicular (Bazzano *et al.* 2015); efectos que se vieron asociados con un estado metabólico empobrecido a nivel ovárico (Bazzano *et al.* 2017). Es por todo lo expuesto que el modelo de obesidad inducido por CAF es el que se utilizó en el presente trabajo y será detallado en lo sucesivo.

1.5 Disfunciones asociadas al desarrollo de obesidad

Numerosas son las complicaciones de la salud que trae aparejada la obesidad (Krishan y Randhir 2011; Hruby y Hu 2016). La obesidad se ve asociada con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Poirier *et al.* 2006; Singh *et al.* 2013; Grundy 2004; Kachur *et al.* 2017), diabetes (Dalmas *et al.* 2014; Langley-Evans 2015); cáncer (Schapira *et al.* 1994; Dalamaga 2013; Iyengar *et al.* 2013; Gallagher *et al.* 2015), trastornos en los huesos, músculos, articulaciones y tejido conectivo (Felson *et al.* 1988; Courties *et al.* 2017) y los problemas

reproductivos (van der Steeg *et al.* 2008; Dağ *et al.* 2015; Campbell *et al.* 2015; Stang *et al.* 2016; Giviziez *et al.* 2016). Cabe aclarar, que cuando dichas enfermedades cursan asociadas a obesidad, en general, el pronóstico es peor; así, la obesidad disminuye la calidad y la esperanza de vida de los individuos (Hruby *et al.* 2016).

Por último, y no por ello de menor importancia, dentro de las consecuencias que conlleva esta patología se incluye el estigma y las consecuencias psicológicas y sociales que ello produce al individuo obeso (Devaux *et al.* 2015).

1.6 Efecto de la obesidad sobre la reproducción femenina

La obesidad genera efectos adversos sobre la salud en cada etapa del ciclo de vida de un individuo, afectando negativamente a diversos órganos y sistemas, sin ser el aparato reproductor su excepción. Si bien esta patología afecta tanto a hombres como mujeres, en particular, la obesidad es un problema común entre las mujeres en edad reproductiva y se asocia con secuelas que afectan la capacidad reproductiva de la mujer (Campbell *et al.* 2015).

El efecto negativo que la obesidad ejerce sobre la fertilidad femenina fue descrito ya por Hipócrates en su obra *Corpus Hipocraticum*: "...la gente de tal constitución no puede ser prolífica... la culpa es de la gordura y la flacidez. El útero no puede recibir el semen y menstrúan poco y con poca frecuencia..." (Brewer y Balen 2010; Lloyd *et al.* 1978). En relación a ello, Hartz y cols. fueron pioneros en demostrar que la irregularidad del ciclo menstrual y la anovulación se correlacionaban con el sobrepeso y la obesidad. De hecho, ya en 1979, en un estudio realizado con 26.638 mujeres, muestran que las mujeres obesas presentan un incremento de 3,1 veces las tasas de trastornos menstruales respecto de las mujeres con peso normal (Hartz *et al.* 1979).

Más recientemente, diferentes estudios han reportado que las pacientes obesas que recurren a fecundación *in-vitro* (FIV) demoran más en conseguir un embarazo que pacientes normopeso (Brewer *et al.* 2010; Tamer *et al.* 2009) y requieren mayores dosis de gonadotrofinas para producir igual cantidad de oocitos (Brewer *et al.* 2010). En un análisis retrospectivo del resultado de FIVs realizadas a 1293 mujeres, se observó que a pesar de que el número de folículos obtenidos fue similar entre pacientes normopeso y obesas, la cantidad de oocitos recuperados y de oocitos en metafase II era inferior en las pacientes obesas; demostrándose que la obesidad se asocia con una menor calidad oocitaria (Dokras *et al.* 2006; Wittemer *et al.* 2000).

Además, se sabe que la obesidad produce una reducción en las tasas de embarazo, en un 8% en mujeres con sobrepeso y un 18% en pacientes obesas (Elia 2015; Dağ *et al.* 2015); y que dicha reducción se observa tanto en embarazos alcanzados luego de recurrir a ART

(técnicas de reproducción asistida, de sus siglas en inglés) como en ciclos naturales (Shah et al. 2011). En contraposición a estas observaciones, un meta análisis realizado con 4758 mujeres que recurrieron a oocitos de donantes describió que las tasas de embarazo, de abortos espontáneos y de niños nacidos vivos son similares entre mujeres obesas y de peso normal (Jungheim *et al.* 2013a) in embargo, otros autores señalan que las tasas de abortos espontáneos también se ve aumentada debido a la obesidad y que se producen como consecuencia de la mala calidad oocitaria (Fedorcsak *et al.* 2004; Lashen *et al.* 2004; Robker 2008; Purcell y Moley 2011). Sin embargo, otros autores han descrito que aún cuando se recurre a oocitos de donantes, las tasas de aborto son mayores en pacientes obesas que en pacientes normopeso, demostrándose que las pacientes obesas presentan mayores tasas de abortos aun cuando la calidad oocitaria/embrionaria es óptima (Bellver *et al.* 2003). Estos hallazgos, junto con los presentados por otros autores, señalan que la disminución en las tasas de embarazo de las pacientes obesas son consecuencia de alteraciones en la receptividad uterina (Bellver *et al.* 2007; Dessolle *et al.* 2009; DeUgarte *et al.* 2010). En relación a ello, un análisis de la expresión génica gran escala (*microarray*) utilizando biopsias de tejido endometrial durante la ventana de implantación ha revelado una desregulación génica en mujeres obesas en comparación de mujeres de peso normal (Bellver *et al.* 2011).

Por otro lado, las mujeres obesas durante el embarazo enfrentan complicaciones médicas que incluyen el aumento de partos pre-término, mayores tasas de pérdidas de embarazo, hipertensión, preeclampsia y diabetes gestacional (Bellver *et al.* 2003; Cedergren y Kallen 2003; Pathi *et al.* 2006; Athukorala *et al.* 2010; Weiss *et al.* 2004; Roman *et al.* 2007).

Además, las gestantes obesas son más propensas a requerir cesárea primaria o parto instrumentado; presentando mayores índices de morbilidad perioperatoria (Ryan 2007). Dichos nacimientos presentan, frecuentemente, dificultades técnicas, aumentándose las tasas de infección, desgarros, hemorragia y trombosis, en comparación con los partos y cesáreas de mujeres no obesas.

Por otro lado, la anestesia perioperatoria plantea un reto más en las gestantes obesas, lo cual conlleva, muchas veces, a empeorar el cuadro clínico (Aricha-Tamir *et al.* 2012).

Aunque varios estudios se han centrado en la correlación entre la obesidad y el aumento de la prevalencia de la cesárea, los mecanismos subyacentes se desconocen. La reducción en la contractilidad miometrial por parte de las gestantes obesas al momento del parto parece ser uno de los mecanismos subyacentes; sin embargo los resultados disponibles hasta la actualidad resultan controversiales (Hajagos-tóth *et al.* 2017).

Por último, la obesidad en el embarazo confiere serios riesgos para la salud fetal, entre los que se destacan un mayor riesgo de sufrir anomalías congénitas (como defectos del

tubo neural o insuficiencia cardíaca congénita), macrosomía fetal, sufrimiento fetal, morbilidad y mortalidad perinatal (Cedergren y Kallen 2003; Szabo 2019; Ramsay *et al.* 2006; Scialli 2006).

Todo lo anteriormente expuesto demuestra que la obesidad impacta negativamente sobre la salud reproductiva femenina en múltiples niveles, desconociéndose aún los mecanismos por los cuales lo lleva a cabo. Las mujeres obesas tienen alta probabilidad de sufrir disfunción menstrual, anovulación, infertilidad y complicaciones durante el embarazo y el parto (Figura 2). (Elia *et al.* 2015, Dağ *et al.* 2015).

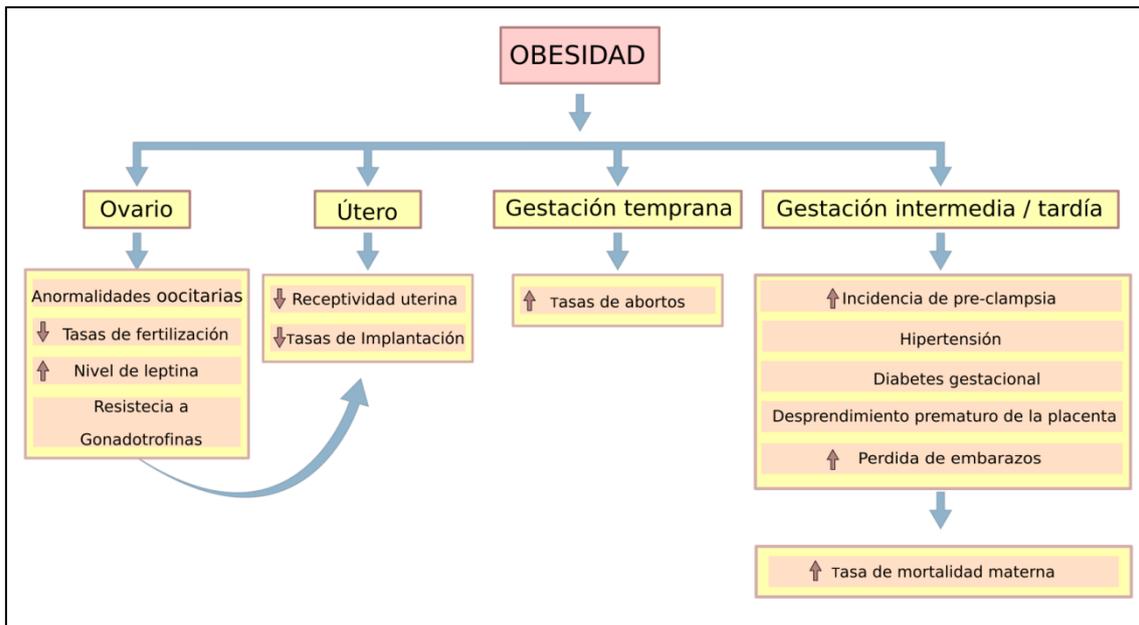


Figura 2: Efectos de la obesidad sobre la salud reproductiva femenina. Modificado de: "Reproductive Disorders in Obesity." (Elia *et al.* 2015).

2 El tracto reproductor femenino

Los órganos que conforman el aparato reproductor femenino son comunes a todos los mamíferos, a pesar de que existen algunas diferencias entre las especies. En la rata, el sistema reproductor comprende ovarios, oviductos, vagina y un útero de tipo bipartito dúplex o bicorne(Figura 3) (Cooke *et al.* 2013).

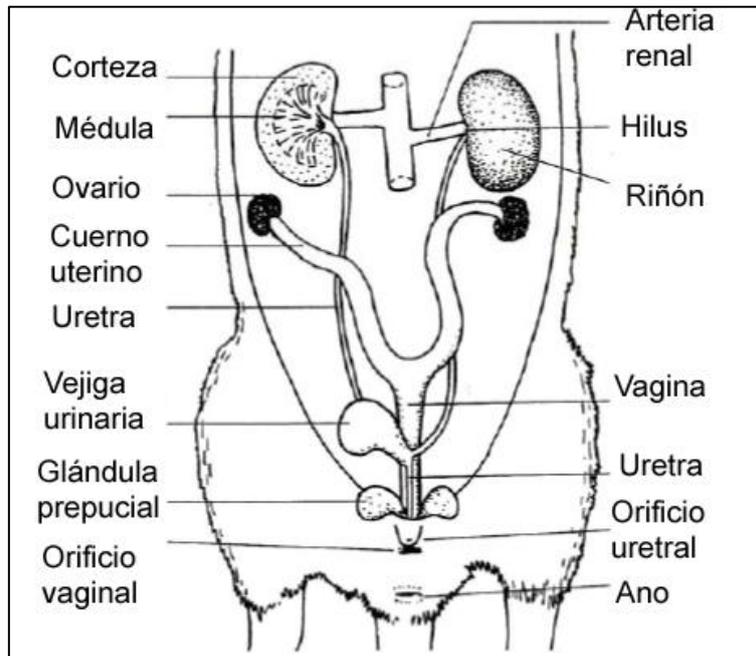


Figura 3: Diagrama de una vista ventral del sistema urogenital femenino en la rata. *Modificado de "The rat: a study in behavior" (Barnet 2007).*

2.1 Los ovarios

El ovario (lat. *ovum*, huevo; gr. *ooforon*) o gónada femenina posee dos funciones principales; la primera de ellas es la producción de células germinales (oocitos) que permite la continuidad de la especie, y la segunda radica en la generación de moléculas bioactivas, principalmente esteroides y factores de crecimiento, que resultan cruciales para la funcionalidad ovárica, la regulación del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal y el desarrollo de características sexuales secundarias (Edson *et al.* 2009).

En ratas, los ovarios son órganos pares y cada uno de ellos se divide en dos secciones bien diferenciadas: la corteza periférica y la médula central (Figura 4). Al alcanzar la madurez sexual, la corteza contiene numerosos folículos (F) en distintos estadios de desarrollo y cuerpos lúteos (CL). La médula, en cambio, ubicada en la zona central del ovario, se encuentra muy inervada y posee una importante vasculatura.

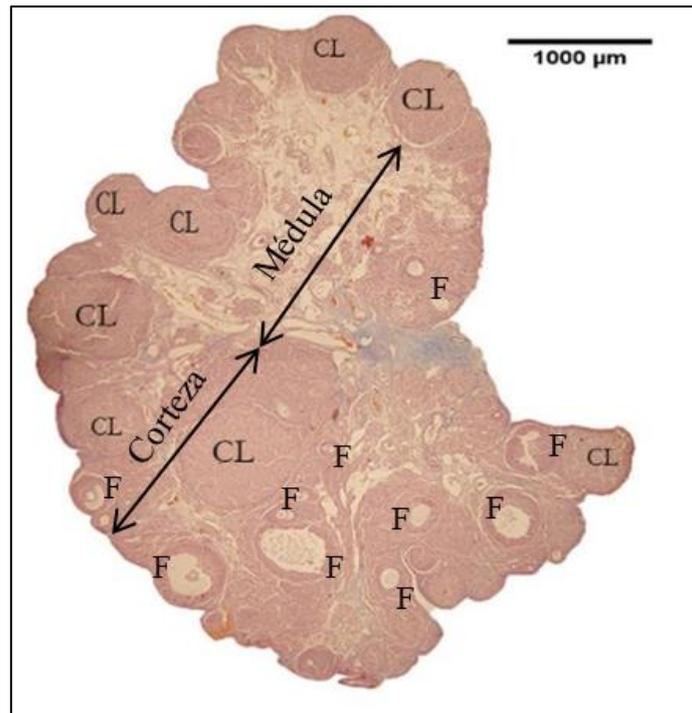


Figura 4: Corte histológico de ovario de rata donde se diferencian la médula, la corteza, folículos en diferente grado de desarrollo (F) y cuerpos lúteos (CL). Coloración: Tricrómico de Masson. *Modificado de: "Coenzyme q10 restores the obesity-decreased ovulation rates" (Sarrible et al. 2018).*

2.2 Los oviductos

Los oviductos (lat. *oviductus*, formado a partir de los sustantivos *ovum* = huevo y *ductus* = tubo) son órganos pares con forma de tubo que se extienden en forma bilateral desde el útero hacia los ovarios (Figura 5). Llamados trompas de Falopio en humanos, estos órganos tubulares transportan el oocito recientemente ovulado hasta el útero y proveen el medio ambiente que propicia la fecundación y el desarrollo inicial del cigoto hasta su etapa de mórula (Croxatto 2002).

Macroscópicamente el oviducto puede dividirse en cuatro segmentos: el infundíbulo (segmento contiguo al ovario que presenta forma de embudo), el ampulla (sitio donde ocurre la fecundación, segmento de mayor longitud), el istmo (segmento medio contiguo al útero) y finalmente la porción uterina o segmento intramural que se ubica dentro de la pared uterina y se abre hacia la cavidad del útero (Figura 5) (Hunter 2012).

La luz del oviducto está revestida por un epitelio cilíndrico simple compuesto por células ciliadas que favorecen el transporte oocitario y células no ciliadas secretoras de sustancias nutritivas para los oocitos y embriones. A lo largo del ciclo la relación entre células ciliadas y no ciliadas presentes en el oviducto se modifica. Los estrógenos (E) estimulan la ciliogénesis y los progestágenos (P) incrementan la cantidad de las células secretoras (Hunter 2012; Croxatto 2002).

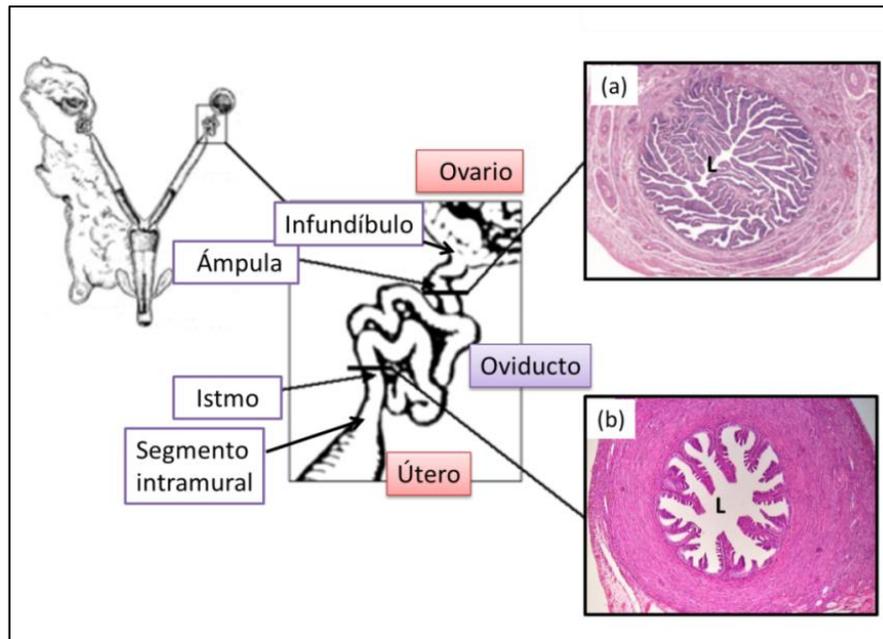


Figura 5: Esquema representativo del oviducto de ratona. Considerando el oviducto en toda su longitud, desde el ovario hasta el útero, se puede distinguir el infundíbulo, el ampulla, el istmo y el segmento intramural o unión útero-tubal. Se muestran cortes histológicos transversales realizados en la región del ampulla (a) y del istmo (b) de la trompa uterina. En el ampulla (a) la mucosa presenta pliegues extensos que se proyectan dentro de la luz tubárica mientras que en el istmo (b) la mucosa se adelgaza reduciéndose considerablemente sus pliegues. Modificado de: “*Physiology of gamete and embryo transport through the fallopian tube*” y *Galería de histología*” (Croxatto 2002; UdelaR 2018).

2.3 El útero

2.3.1 Anatomía e histología

El útero (lat *utērus*, vientre), también denominado matriz, es el órgano de la gestación y el mayor de los órganos del aparato reproductor femenino de la mayoría de los mamíferos. En los mamíferos, el embrión se desarrolla unido al útero materno hasta que el feto es expulsado durante el parto.

Ontológicamente, el útero de los mamíferos se diferencia a partir de los conductos de Müller y consiste típicamente en un epitelio tubular central rodeado de mesénquima no diferenciado en el momento del nacimiento (Cooke *et al.* 2013). El grado en el que se fusionan dichos ductos difiere entre las diferentes especies (Figura 6).

En los humanos los ductos de Müller se fusionan casi por completo, la porción no fusionada originará a las trompas uterinas y la fusionada dará lugar a un útero simple (Figura 6, derecha).

En el caso de los roedores, la porción no fusionada originará los oviductos y los cuernos uterinos. Cranealmente, cada cuerno uterino termina en un oviducto que se encuentra asociado a uno de los ovarios. Los cuernos uterinos se fusionan muy caudalmente

poco antes de conectar con la vagina, originándose un útero bicorne que posee 2 cuellos uterinos (Figura 6, izquierda) (Spencer *et al.* 2012;Cooke *et al.* 2013). Así, aunque los cuernos uterinos parecen estar unidos, cada cuerno desemboca en su propio cérvix; característica anatómica que impide los movimientos embrionarios entre ambos cuernos uterinos (Lima 2015). Es por ello que el número de sitios de implantación (SI) que presenta cada cuerno uterino es igual (o menor) al número de oocitos ovulados por el ovario ipsilateral (mismo lado) a dicho cuerno (Lima 2015). De esta forma, la estructura anatómica del cérvix doble permite diseños experimentales en el que la condición experimental y la condición control pueden ser evaluadas en una misma hembra, herramienta de gran relevancia en numerosas investigaciones.

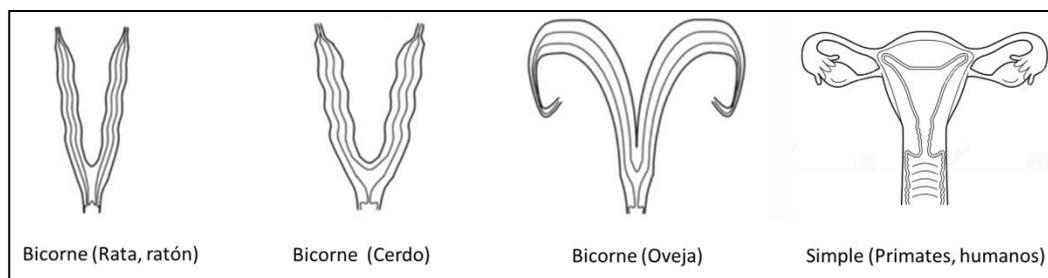


Figura 6: Morfología uterina en los diferentes animales. Los roedores (ratas y ratones) tienen un tipo de útero de tipo doble con cérvix doble. Los cerdos tienen un útero largo bicorne con un cuerpo uterino corto y un solo cuello uterino. Las ovejas tienen un tipo de útero bicorne de longitud media y un cuerpo uterino corto con un solo cuello uterino. Los primates y humanos presentan un útero simple con un cérvix único. Fuente: modificado de “Comparative Developmental Biology of the Uterus: Insights into Mechanisms and Developmental Disruption.” (Spencer *et al.* 2012).

El establecimiento de la histoarquitectura específica del tejido uterino se completa después del parto en roedores, animales domésticos y presumiblemente humanos (Bartol *et al.* 1993; Bartol *et al.* 1999; Spencer *et al.* 2012; Cooke *et al.* 2013).

Los eventos comunes a la morfogénesis uterina postnatal incluyen: organización y estratificación del estroma endometrial; diferenciación y crecimiento miometrial y desarrollo de glándulas endometriales. El momento en que estos eventos ocurren difiere entre las especies; sin embargo, es importante destacar que la morfogénesis del útero es principalmente, si no de forma única, un evento postnatal (Cooke *et al.* 2013). De hecho, la capacidad funcional del útero adulto se establece por acontecimientos asociados con la "programación" de los tejidos uterinos durante la vida prenatal y postnatal (Walker 2011).

Desde el punto de vista histológico, la pared uterina está compuesta por tres capas: endometrio, miometrio y perimetrio (Figura 7).

El endometrio es la mucosa que rodea la cavidad uterina, está constituido por un epitelio cilíndrico simple (con microvellosidades y células ciliadas que se comunican con la

luz del órgano), por la lámina basal y el estroma (con abundante irrigación sanguínea y glándulas de secreción que se abren hacia la luz del órgano) (Morris 1968, Ross *et al.* 2015). El endometrio puede dividirse, morfológicamente, en una capa funcional y una basal. La primera es la encargada de prepararse para la implantación del blastocisto y en ella sucede la proliferación, secreción y degeneración. La capa basal es el sustrato para que el endometrio pueda regenerarse.

El miometrio, es el estrato muscular conformado por una capa circular interna y una longitudinal externa, ambas rodeadas por perimetrio.

El perimetrio, es la capa serosa externa o la cubierta peritoneal visceral del útero que se continúa con el peritoneo pélvico y abdominal (Ross *et. al* 2015).

El endometrio y el miometrio funcionan en conjunto para recibir al embrión, sostener su crecimiento y expulsar al feto en el momento del parto. La preparación de un ambiente receptivo es programada por las hormonas esteroideas ováricas que actúan en forma directa sobre el endometrio y el miometrio, y en forma indirecta a través de diferentes factores de crecimiento y citocinas (Yen 2001).

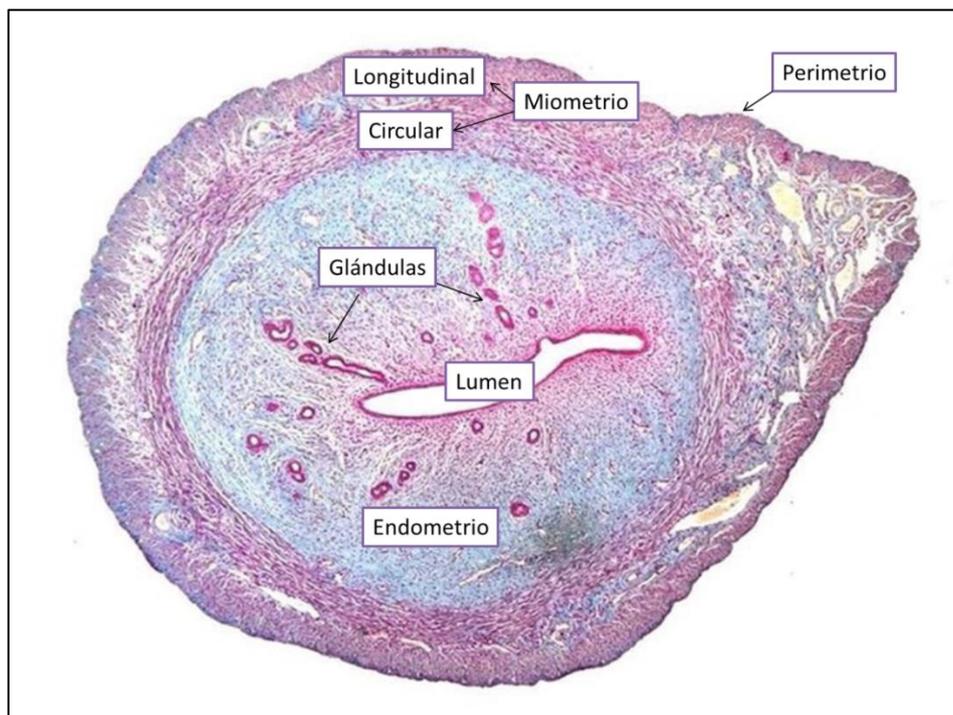


Figura 7: Corte transversal de útero de rata coloreado con Tricrómico de Cajal-Gallego. Se diferencian el lumen uterino rodeado del tejido endometrial en el cual se distingue la presencia de glándulas uterinas. Rodeando al endometrio se observa el tejido miometrial (circular y longitudinal) y finalmente el perimetrio. Aumento: 4x. *Imagen modificada de: "Galería de histología" (UdelaR 2018).*

2.3.2 Funcionalidad uterina

El útero cumple numerosas funciones en el proceso reproductivo, aún en ciclos no concepacionales. Sin embargo, su función primordial es la de acoger al embrión y permitir su implantación. Para ello, el endometrio debe transformarse durante la mitad de la fase secretora en receptivo (Demir *et al.* 2002).

La receptividad endometrial ocurre cuando la mucosa uterina sufre cambios que le confiere la capacidad de permitir que ocurra la implantación embrionaria, proceso por el cual el embrión se adhiere al endometrio, invade el epitelio endometrial y toma contacto directo con la vasculatura materna para la formación de la placenta (Cavagna *et al.* 2003). Para ello, el útero adquiere ligandos adhesivos y pierde componentes que pudieran inhibir la adhesión del embrión al epitelio endometrial (Aplin 2000). Todo este proceso se produce en respuesta a estímulos endocrinos (especialmente esteroides ováricos), paracrinos y/o autocrinos que ocurren desde el inicio del ciclo reproductor (Cavagna *et al.* 2003). Es por ello que el éxito del proceso implantatorio no depende exclusivamente de la calidad embrionaria sino también de la receptividad endometrial. En relación a ello, se ha descrito que la receptividad uterina disminuida es una de las principales razones de abortos aun cuando la concepción se realiza mediante ART (Edwards 1995).

Debido a la complejidad del proceso implantatorio, alteraciones en alguno de estos mecanismos puede conducir a la asincronía entre el desarrollo embrionario y el uterino, complicando así el proceso implantatorio y, consecuentemente, la prosecución de la gestación.

Otra gran función del útero es el mantenimiento del tono miometrial. Esto resulta de vital importancia tanto en ciclos concepacionales como no concepacionales dado que interviene en diversos procesos, como son la menstruación (en el caso de humanos), el transporte embrionario y de espermatozoides, la implantación embrionaria, la gestación y el parto (Wray *et al.* 2001). Se ha visto que alteraciones en la contractilidad uterina causan trastornos como infertilidad, fracaso de la implantación, dismenorrea, endometriosis, aborto espontáneo y parto prematuro (Aguilar y Mitchell 2010).

El músculo liso uterino- o miometrio- se contrae espontáneamente (Aguilar y Mitchell 2010). Dichas contracciones son coordinadas y reguladas por mediación nerviosa, aunque no necesariamente son iniciadas por el impulso nervioso (Kuijsters *et al.* 2017; Burnstock y Prosser 1960).

La naturaleza de las contracciones, su frecuencia, amplitud y duración, está determinada por la frecuencia de descarga de los potenciales de acción, por la duración de la serie de potenciales de acción y por el número total de células estimuladas (Laws *et al.* 2009).

Las uniones estrechas -o “gap junctions”- existentes entre las células miométriales son fundamentales para coordinar la actividad contráctil miométrial, ya que los músculos lisos no están organizados en fibras, fibrillas y filamentos como los músculos esqueléticos (Morris 1968, Carsten *et al.* 1990, Egarter y Husslein 1992, Laws *et al.* 2009).

El concepto de marcapasos en el miometrio ha sido considerado e investigado durante muchos años. Décadas de investigación empleando diferentes abordajes de estudio, desde técnicas histológicas hasta electrofisiológicas, no han demostrado evidencia de la presencia de células con las propiedades histológicas y electrofisiológicas características de un marcapasos funcional en el útero (Aguilar and Mitchell 2010). El llamado “marcapasos uterino” no se ajusta fácilmente a la definición de diccionario de lo que debería ser un marcapasos.

El útero, a diferencia del corazón, no presenta un marcapasos único y fijo que genera un potencial de acción que se propaga globalmente a través de vías definidas. Se ha descrito que éste presenta muchos “marcapasos” distribuidos por todo el órgano, situación similar a la del intestino. Así, el útero se contrae de manera coordinada, con muchos “marcapasos” activándose durante la fase de reclutamiento de cada contracción (Young 2018; Aguilar y Mitchell 2010). Esta coordinación a nivel de órgano es necesaria porque si solo se contrajera una porción del útero, las partes quiescentes de la pared uterina se alargarían. La laxitud de la pared daría lugar a bruscos aumentos de la presión intrauterina, y las contracciones no generarían la presión necesaria, por ejemplo, al momento del parto. Sin embargo, aún no existe un consenso en cómo los “marcapasos” uterinos se comunican entre sí para crear contracciones coordinadas a nivel del órgano y evitar la generación aleatoria de potenciales de acción logrando así que todas las partes del útero pueden contraerse al mismo tiempo y viceversa (Young 2018). Claramente, se necesita una mayor investigación para comprender la regulación y, por lo tanto, la desregulación de la contractilidad uterina que causa una variedad tan amplia e importante de trastornos reproductivos (Aguilar y Mitchell 2010).

Independientemente del origen de la contracción, la actividad contráctil de cada miocito uterino está mediada por cambios en la concentración de Ca^{2+} . La liberación de Ca^{2+} de las reservas intracelulares, junto con el flujo desde el espacio extracelular, activa las vías bioquímicas que conducen al entrecruzamiento de actina-miosina y al consecuente desarrollo de la fuerza contráctil del músculo liso uterino (Sperelakis *et al.* 1992). De hecho, agentes bloqueantes de los canales de Ca^{2+} previenen eficazmente el flujo de Ca^{2+} , inhibiendo la contracción uterina. Por su parte, agentes uterotónicos, como las prostaglandinas (PGD₂, PGE₂, PGF₂ α , PGI₂) y la oxitocina, aumentan la actividad miométrial actuando esencialmente como ionóforos de Ca^{2+} (Chen *et al.* 2013).

La motilidad uterina sufre cambios a lo largo del ciclo sexual. Si se produce la fecundación, las condiciones del órgano cambiarán radicalmente, propiciándose la quiescencia del órgano que resulta imprescindible para permitir el correcto contacto entre el embrión y el endometrio (Kuijsters *et al.* 2017). Esta se mantiene hasta el momento del parto, momento en el que la actividad contráctil se incrementa significativamente, facilitando la expulsión del feto y el alumbramiento (Kuijsters *et al.* 2017). Dichos cambios son regulados por diversos factores entre los que se destacan las hormonas esteroideas estradiol (E2) y progesterona (P4) y los receptores adrenérgicos (Chen *et al.* 2013).

El E2 estimula las contracciones uterinas, mientras que la P4 las inhibe (Egarter y Husslein 1992; Kuijsters *et al.* 2017). Los mecanismos por los cuales E2 las estimula involucran el estímulo en la producción y sensibilidad a las prostaglandinas (PGF2 α , PGE2) y de Tromboxano A2 (Fanchin *et al.* 2000; Chen *et al.* 2013; Wilson 1983; Ham *et al.* 1975). En contraposición, P4 contribuye a la quiescencia uterina a través de la inhibición de dichos agentes uterotónicos (Bygdeman *et al.* 1979, Hajagos-tóth *et al.* 2017; Wilson 1983).

El útero de los mamíferos es un órgano con numerosas inervaciones simpáticas, especialmente en los compartimentos miometriales (Latini *et al.* 2008; Chavez *et al.* 2006). La noradrenalina, liberada como consecuencia de la activación simpática, actúa directamente a través de los receptores adrenérgicos uterinos (Engstrom *et al.* 2001; Roberts *et al.* 1989). El estímulo que noradrenalina ejerce sobre la contracción miometrial resulta crítica al momento en que los embriones son transportados intrauterinamente antes de que ocurra la implantación (Legrand *et al.* 1987; Chen *et al.* 2011). Es ese momento, se ha detectado un aumento de la concentración miometrial de noradrenalina, lo que sugiere un posible rol de la noradrenalina en el proceso implantatorio (Legrand *et al.* 1986).

La liberación de noradrenalina (NA), a partir de la activación simpática, actúa directamente a través de los receptores adrenérgicos (AR) uterinos. El miometrio presenta tanto receptores alfa como beta adrenérgicos (Chen *et al.* 2013). Por tanto, si NA se une a adrenoreceptores de tipo alfa (α AR) miometriales estimula las contracciones, mientras que si se une los de tipo beta (β AR), induce la relajación uterina. Así, la distribución espacio-temporal de los subtipos de AR que el útero expresa parece ser un modulador importante del tono miometrial durante la gestación (Bottari *et al.* 1983; Roberts *et al.* 1989; Chen *et al.* 2013).

3 Ciclos reproductivos

Al igual que la mayoría de los mamíferos placentarios, tanto humanos como ratas poseen ciclos reproductivos regulares en el que tienen lugar cambios fisiológicos, histológicos y citológicos en el tracto reproductivo, iniciados y regulados por el eje hipotálamo-hipofisario-

gonadal. En humanos dicho ciclo es denominado “ciclo menstrual” (Figura 8), mientras que en roedores se lo denomina “ciclo estral”.

3.1 *El ciclo menstrual*

Durante cada ciclo menstrual, el ovario de los primates sufre cambios cíclicos que comprenden dos fases: la **fase folicular** y la **fase luteínica**; siendo la ovulación el evento que ocurre entre ambas fases (Figura 8). Debido a que el útero es un órgano blanco fundamental de las hormonas ováricas, el endometrio experimenta cambios cíclicos en respuesta a las variaciones sufridas por los ovarios. Así, el endometrio experimenta modificaciones estructurales cíclicas que ocurren paralelamente a las ováricas. El ciclo endometrial se divide, también, en dos fases: la **fase proliferativa** (que ocurre de manera simultánea a la fase folicular ovárica) y la **secretora** (simultánea a la fase luteínica) (Figura 8).

En las mujeres la duración del ciclo es de aproximadamente 28 días, comenzando cada ciclo con la menstruación, es decir con el inicio de la fase folicular, que comprende unos 14 días. La **fase folicular** se inicia con el desarrollo de una pequeña cantidad de folículos primarios por la acción de las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH). La selección de los folículos dominantes ocurre entre los días 5 y 7 del ciclo menstrual. Durante los primeros 8 a 10 días del ciclo, la FSH es la hormona principal que influye sobre el crecimiento de los folículos (Rimon-Dahari *et al.* 2016). Bajo el influjo de la FSH y posteriormente de LH, los niveles plasmáticos de estradiol, producido por las células de la granulosa del folículo en desarrollo, aumentan progresivamente hasta alcanzar un máximo inmediatamente antes de la ovulación (Baerwald *et al.* 2012). Al final de la fase folicular, antes de la ovulación, la concentración de progesterona comienza a aumentar por efecto de la LH. La ovulación es inducida por un aumento vertiginoso de la concentración de LH, que ocurre en forma concomitante con un incremento menor en la concentración de FSH.

La expulsión del oocito se produce unas 34 h a 36 h después del inicio del aumento de la LH o alrededor de 10 h a 12 h después del incremento máximo de esta hormona (Rimon-Dahari *et al.* 2016).

Los E producidos como consecuencia de la maduración folicular impactan s nivel endometrial, estimulando la proliferación de las células endometriales. Al comienzo de la **fase proliferativa** la mucosa endometrial se encuentra adelgazada y con escasa cantidad de glándulas. Durante esta fase, bajo la acción de E2 se produce la proliferación de células epiteliales en el endometrio. La superficie epitelial se incrementa aumentando su espesor y comienzan a formarse glándulas endometriales. La fase proliferativa continúa hasta un día

después de la ovulación y en el final de esta fase, se distinguen glándulas con luz estrecha y en la región basal de las células epiteliales, acumulación de glucógeno.

La **fase luteínica** se inicia justo después de la ovulación, mientras las células de la granulosa y de la teca del folículo ovulado sufren una rápida transformación morfológica para formar el cuerpo lúteo. EL cuerpo lúteo secreta estrógenos y grandes cantidades de progesterona. Por la acción principalmente de la progesterona, el endometrio inicia **su fase secretora**, etapa indispensable para que se desarrolle receptividad endometrial y el útero esté preparado para la implantación en caso de que el oocito sea fecundado (Baerwald *et al.* 2012). En la fase secretora, el grosor endometrial no aumenta, las glándulas crecen y adquieren un aspecto tortuoso y su luz se distiende a medida que se llena de productos de secreción. El líquido mucoide producido por el epitelio glandular tiene muchas sustancias nutritivas, en particular glucógeno, que son necesarias para sustentar el desarrollo de la implantación embrionaria, en el caso de que esta ocurra. En esta fase, las mitosis son infrecuentes y el crecimiento observado es producto de la hipertrofia de las células epiteliales, el aumento de la vascularización y el edema del endometrio.

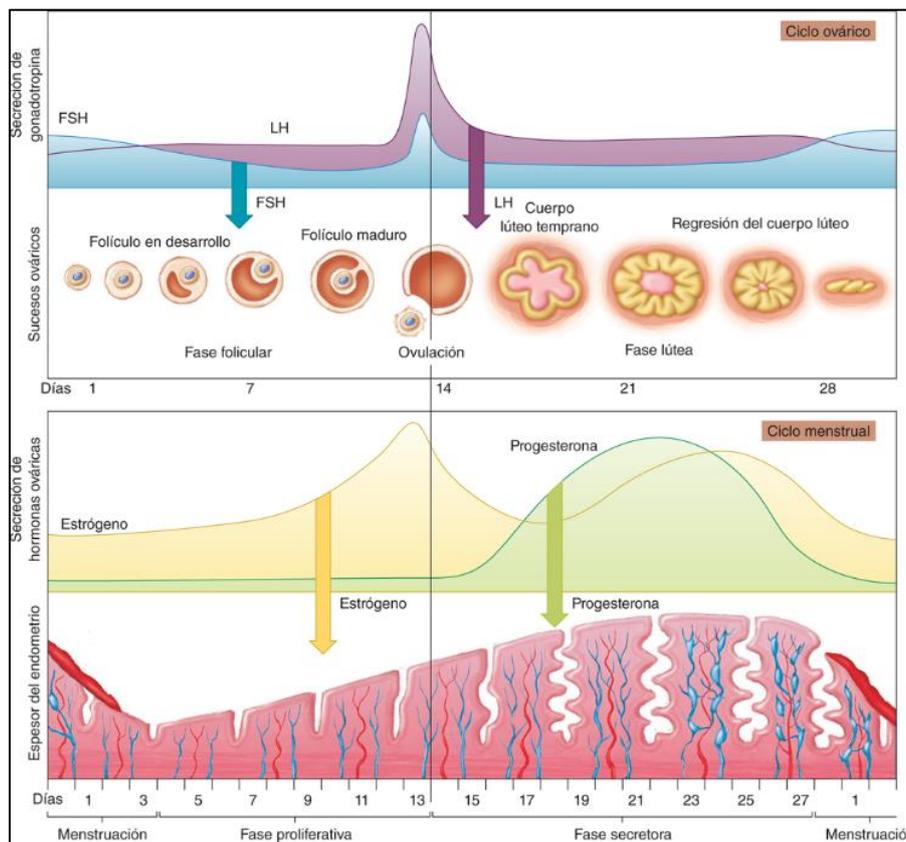


Figura 8: Esquema de los eventos fisiológicos y anatómicos durante el ciclo menstrual. Se muestran las curvas hormonales, la maduración de los folículos en el ovario (fase folicular y lútea) y el estado del endometrio (fase proliferativa y fase secretora) a lo largo de los días. P: Progesterona; E: Estradiol; FSH: Hormona folículo estimulante; LH: Hormona luteinizante. *Modificado de: "Fisiología Humana" (Fox 2008).*

Si la fecundación no ocurre, el cuerpo lúteo degenerará, produciéndose así una disminución en las concentraciones hormonales, que dará origen a la hemorragia mensual.

Por el contrario, si la fecundación ocurre, el cuerpo lúteo se mantiene y continúa secretando progesterona y estrógenos. La gonadotropina coriónica humana (hCG), que inicialmente es sintetizada por el embrión y más tarde por la placenta, estimula el cuerpo lúteo y es responsable de su mantenimiento durante el embarazo.

3.2 El ciclo estral

El ciclo reproductivo de la rata es conocido como ciclo estral. Éste comprende modificaciones estructurales (a nivel uterino, ovárico, oviductal, vaginal y vulvar) y conductuales que sufren las hembras una vez que alcanzan la pubertad y que se repite de forma periódica y característica según la especie.

La rata es un mamífero no estacional, de ovulación espontánea y poliéstrica; el ciclo ovárico se repite a lo largo de todo el año y la ovulación no depende del estímulo de la cópula (Allen 1922; Marcondes *et al.* 2002).

En roedores, el ciclo dura entre cuatro y cinco días y los cambios histológicos se ven reflejados tanto en el útero como en la vagina de la rata, comprendiendo clásicamente 4 fases sucesivas: **proestro**, **estro**, **metaestro** y **diestro** (Bertolin *et al.* 2014).

En la rata, el **proestro** es la etapa del ciclo que marca el inicio de la fase folicular con la consiguiente liberación de las gonadotropinas, principalmente de hormona FSH que da lugar a la maduración y desarrollo folicular y, por tanto, a la producción de E.

El extendido vaginal en esta etapa se caracteriza por la presencia predominante de células epiteliales nucleadas (células basales) y, en ocasiones, algunas células cornificadas (Marcondes *et al.* 2002).

Histológicamente el útero en el proestro se distingue por su típico endometrio ondulado con proyecciones del tejido endometrial hacia el lumen y su amplia luz (Kemmochi *et al.* 2013).

La duración del proestro es de 12 a 14 horas, luego se continuará con el pico de LH entrando en la fase de **estro** y consecuentemente la ovulación.

El estro se caracteriza por ser el período en el cual la hembra está dispuesta a recibir al macho y en el extendido vaginal es notable la presencia de células cornificadas de forma irregular (Marcondes *et al.* 2002; Westwood 2008).

A nivel uterino, el líquido extracelular aumenta en todo el endometrio (Wood *et al.* 2007). El edema comienza a disminuir en el estro tardío y la apoptosis del estroma es más alta en este punto, correlacionado con los niveles relativamente bajos de E2 y P4. Los cuernos

uterino se distinguen por su apariencia turgente casi transparentes y sus paredes adelgazadas (Bertolin *et al.* 2014)

Anatómicamente el útero durante el proestro y el estro es grueso y edematoso, su apariencia distendida se debe a la hiperfunción de las glándulas uterinas (Bertolin *et al.* 2014; Kemmochi *et al.* 2013).

Con la ovulación y la formación del CL, se ingresa la fase lútea, que en roedores comprende el metaestro y el diestro.

El **metaestro** es una fase de corta duración (6 a 8 horas) en que los CLs inician su desarrollo y comienzan a sintetizar P4. Si no se produce la fecundación, a nivel vaginal se observa la presencia de un gran número de leucocitos y escasa cantidad de células cornificadas (Westwood 2008). En el útero, se produce una reducción en las tasas de proliferación del epitelio luminal y la disminución de la apoptosis estromal; el epitelio pierde su organización definitiva, muestra degeneración vacuolar, aparecen leucocitos en la membrana basal y las glándulas uterinas muestran una actividad mínima.

Luego se continúa la fase de **diestro**, momento en el que los CLs alcanzan su máxima actividad. Este período es el más extenso del ciclo dado que se extiende entre 50 a 55 horas.

En esta etapa las secreciones del ovario preparan al tracto reproductivo para recibir al oocito fecundado, pudiéndose observar en los extendidos vaginales la aparición de células esféricas nucleadas (células basales) y escasos leucocitos (Westwood 2008). En el útero el recambio a un proceso regenerativo determina la aparición de diestro, las mitosis son frecuentes en las glándulas, disminuyendo en número a medida que aumenta la actividad funcional (Westwood 2008).

A nivel anatómico, el útero es delgado y alargado y la pared uterina está colapsada y anémica durante el diestro y el proestro,

Si no se produce fecundación, se produce la regresión del cuerpo lúteo y el consecuente reinicio de un nuevo ciclo.

En caso de preñez, los niveles de P4 continúan siendo elevados debido a que los CLs continúan siendo funcionales; permaneciendo el animal en una etapa conocida como anestro gestacional.

4 Gestación.

Durante la gestación, el endometrio sufre cambios importantes en su composición celular que se reflejan en cambios pronunciados en la síntesis y secreción de proteínas.

En la rata, la gestación se extiende por 21-22 días y puede ser dividida en tres etapas principales: pre-implantación, implantación y post-implantación.

4.1 Pre-implantación

4.1.1 Desarrollo embrionario

El desarrollo embrionario de pre-implantación abarca el período desde la fecundación hasta la implantación (Wang y Dey 2006)(Figura 9).

En ratas, la fecundación se produce en el ampulla del oviducto marcando el inicio de la gestación y formación de la cigota, primera célula con la dotación genética completa, a partir de la cual se desarrollará el embrión(Armant 2005).

La cigota sufre una serie de divisiones mitóticas, sin crecimiento celular, formando las células denominadas blastómeras. Luego, el embrión atravesará el proceso de compactación, formase lo que se conoce como **mórula** (lat. *morum*, mora)(Wang yDey 2006). Este proceso es uno de los mecanismos morfogenéticos cruciales en el desarrollo embrionario temprano, representando el inicio de la polaridad de los balstómeros externos (Mihajlovic y Bruce 2017).

En la rata, el estadio de **mórula** abarca desde embriones de 8-12 células (mórula temprana, embriones con blastómeras con cierto grado de compactación) hasta 16 y 32-células (mórula tardía, compactada)(Strangeways Research Laboratory 1966; Witschi 1962). En la rata, las mórulas de 12-16 células dejan el oviducto para ingresar en la cavidad uterina (Witschi 1962; Enders y Schlafke 1967).

En el estadio de mórula compactada, el embrión presenta dos capas, la externa está formada por células polarizadas que rodea un pequeño grupo de células apolares internas que contribuirán a la progenie del linaje pluripotente embrionario (Johnson *et al.* 2004). La compactación es crucial para el desarrollo, dado que ella contribuye al inicio y progresión del segundo gran evento del desarrollo preimplantacional: la cavitación (Enders y Schlafke 1967; Mihajlovic y Bruce 2017).

La cavitación se manifiesta por la acumulación de fluido entre las blastómeras internas lo que conduce a la formación de una cavidad central llamada cavidad blastocélica o blastocele y a la diferenciación de dos linajes: el trofoectodermo (TE) y el macizo celular interno (MCI)(Mihajlovic y Bruce 2017). El MCI dará origen al embrión propiamente dicho con todas sus capas celulares; mientras que el TE estará involucrado en las interacciones con el útero durante la implantación. En ese momento, el embrión pasa a ser denominado **blastocisto inicial** o temprano.

Hasta aquí, el desarrollo del embrión se encuentra bajo el control de macromoléculas de origen materno que se acumulan en el citoplasma del oocito durante la oogénesis (Armant 2005). En la rata, desde la etapa de dos células y su desarrollo ulterior dependerá de la activación del genoma embrionario, que codifica diversos factores de crecimiento, componentes de uniones celulares y otras macromoléculas necesarias para su desarrollo (Armant 2005).

A medida que la embriogénesis avanza, el blastocisto inicial se expande por acumulación continua de líquido en la cavidad blastocélica, momento en el cual adquiere el nombre de **blastocisto expandido** (Johnson *et al.* 2004). La cavidad blastocélica se presenta bien definida y se distingue el MCI con un anillo de células TE alrededor, las cuales son designadas como células trofoectodérmicas polares si se encuentran cubriendo al MCI o como trofoectodérmicas murales si se encuentran recubriendo al blastocele.

Como se observa en la figura 9, una capa de células derivadas del MCI, formarán el hipoblasto (o endodermo primitivo), mientras que las células remanentes del MCI, mantendrán su pluripotencialidad y formarán el epiblasto (o ectodermo primitivo) (Wang y Dey 2006).

Como consecuencia de la acumulación de fluido y por la acción de enzimas proteolíticas, el blastocisto se libera de la zona pelúcida (hatching) lo que le permite iniciar la adhesión en el epitelio uterino y comenzar el proceso de implantación (Witschi 1962; Enders y Schlafke 1967; Wang y Dey 2006).

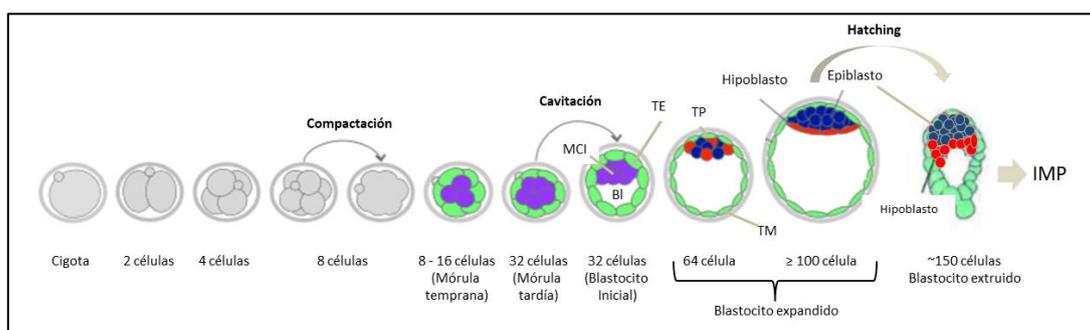


Figura 9: Secuencia temporal de los principales eventos en el desarrollo embrionario murino de pre-implantación. BI: Blastocele, MCI: macizo celular interno, TE: trofoectodermo, TM: trofoectodermo mural, TP: trofoectodermo polar. IMP: implantación. *Modificado de: "The First Cell-Fate Decision of Mouse Preimplantation Embryo Development: Integrating Cell Position and Polarity" (Mihajlovic y Bruce 2017).*

4.1.2 Transporte embrionario intrauterino

En la mayoría de las especies de mamíferos estudiadas, la distribución espacio-temporal de embriones en el útero materno es altamente conservada. En ratones, ratas,

cerdos y conejos, los embriones ingresan al útero en el estadio de mórula compacta o blastocisto inicial. A continuación, estos son distribuidos uniformemente a lo largo de los cuernos uterinos para, a continuación, producirse la implantación (Chen *et al.* 2013).

En la rata, los embriones, al ingresar al útero materno, se agrupan al inicio de cada cuerno uterino (Witschi 1962; Chen *et al.* 2013). Luego, se separaran uniformemente a lo largo del eje longitudinal uterino hasta que, finalmente, fijan sus posiciones y se implantan (Figura 10)(Chen *et al.* 2013).

En esta instancia, además, se produce la orientación de los embriones en el eje vertical uterino (mesometrial-antimesometrial); fenómeno que establece la posición del eje embrionario y la formación de la placenta (Chen *et al.* 2013).

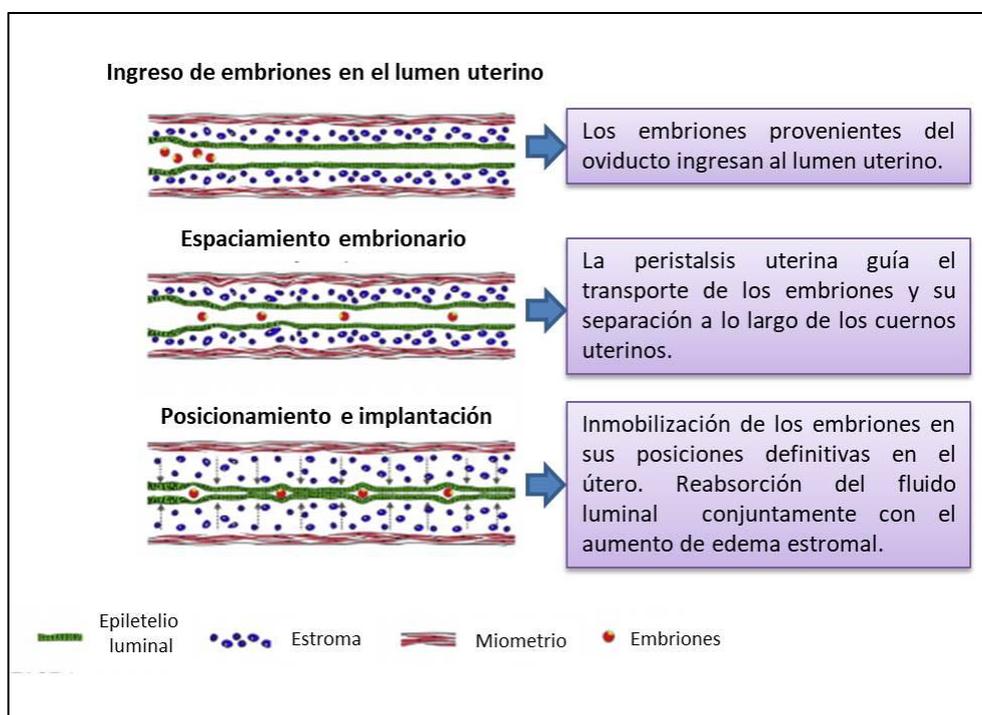


Figura 10: Esquema que ilustra el proceso de distribución de embriones a lo largo del eje longitudinal uterino murino. Modificado de: "Navigating the site for embryo implantation: biomechanical and molecular regulation of intrauterine embryo distribution"(Chen *et al.* 2013).

El estudio de diversas moléculas y vías de señalización involucradas en la distribución de embriones intrauterinos han puesto de manifiesto que la actividad contráctil uterina es quien guía el transporte embrionario intrauterino (Chen *et al.* 2013; Kuijsters *et al.* 2017). En relación a ello, se ha descrito que la interferencia de la actividad contráctil miometrial con métodos farmacéuticos como la relaxina, los fármacos adrenérgicos y el inhibidor de la síntesis de PG (indometacina) altera el espaciamiento embrionario a lo largo el eje longitudinal uterino, así como la orientación del embrión en el eje vertical uterino (Kennedy 1977; Chen *et al.* 2011, 2013; Legrand *et al.* 1989; Wellstead *et al.* 1989).

En particular, se ha descrito que la activación transitoria del $\beta 2$ AR uterino modifica la actividad contráctil uterina, alterándose en el espaciamiento intrauterino embrionario consecuentemente (Chen *et al.* 2011). La administración de agonistas del $\beta 2$ AR genera la aglomeración de embriones en el eje longitudinal uterino y altera la orientación normal del embrión en el eje vertical uterino (Rogers *et al.* 1983).

En su vía clásica, los agonistas del $\beta 2$ AR inducen la relajación del músculo liso a través de mecanismos que involucran la captación de Ca^{2+} por parte de las reservas intracelulares junto con la disminución del flujo de Ca^{2+} desde el espacio extracelular. Por tanto, la disminución de Ca^{2+} en el citoplasma del miocito inactiva las vías bioquímicas que conducen al entrecruzamiento de actina-miosina y al consecuente desarrollo de la fuerza contráctil del músculo liso uterino (Sperelakis *et al.* 1992; Aguilay y Mitchell 2010)

Además, se ha descrito otra vía de acción del $\beta 2$ AR que involucra al receptor 3 del ácido lisofosfatídico (LPA_3) (Chen *et al.* 2013; Hama *et al.* 2007). En relación a ello, se ha descrito que la activación del AR $\beta 2$ *down*-regula la expresión génica de *Lpa₃* (Chen *et al.* 2011) induciendo así la relajación miometrial

LPA_3 ha sido identificado como regulador de diversas funciones relacionadas a la reproducción femenina. La expresión génica de *Lpa₃* ha sido detectada en oviducto, placenta y útero, sin embargo, esta no ha sido detectada en ovario y oocitos (Ye *et al.* 2006).

LPA_3 está involucrado en los procesos de implantación y el espaciamiento embrionario (Hama *et al.* 2007; Ye *et al.* 2006). Estudios con ratones deficientes de LPA_3 (*Lpa₃* (-/-)) mostraron una reducción en el número de sus camadas, un retraso en la implantación y una alteración en el posicionamiento intrauterino de los embriones (Ye *et al.* 2006). Por otro lado, se ha demostrado que el LPA vía LPA_3 incrementa la síntesis de la enzima Ciclooxygenasa 2 (COX-2) y de PGE2 en el útero, estimulando así su actividad contráctil (Hama *et al.* 2007; Sordelli *et al.* 2012).

La expresión del ARNm *Lpa₃* ha sido detectada en el epitelio uterino de ratón (fuertemente en el epitelio luminal y apenas detectable en el epitelio glandular) durante la pre-implantación (Ye *et al.* 2006, 2011), mientras que el $\beta 2$ AR se expresa tanto en el epitelio luminal y el miometrio (Chen *et al.* 2011). Por ello, se cree que el *cross-talk* entre ambos receptores posiblemente ocurra en el epitelio luminal; las interacciones de tipo paracrina aún no han sido estudiadas (Chen *et al.* 2011).

Las implicancias clínicas que puede tener la activación adrenérgica anormal sobre el resultado de la gestación revisten gran importancia, ya que el estrés materno puede elevar las concentraciones de ligandos endógenos para los AR (Ferry *et al.* 1999), alterándose, consecuentemente el desarrollo de la gestación. En concordancia con ello, estudios

epidemiológicos han demostrado que el estrés materno en el embarazo temprano está fuertemente asociado con diversas complicaciones, como sangrado y pérdida del embarazo (Ferry *et al.* 1999; Zubrick 2008).

Debemos tener presente que alteraciones en actividad contráctil uterina (ya sea hiper o hipo-actividad) pueden dar lugar a la implantación de embriones en sitios desfavorables (Bulletti y Ziegler 2006; Fanchin *et al.* 1998; Fanchin *et al.* 2009; Chen *et al.* 2013). Estudios con ratones modificados genéticamente y observaciones clínicas, han puesto en evidencia que una regulación precisa de la ubicación de los embriones en el útero materno resulta crítica para la gestación en curso. De hecho, alteraciones en el lugar donde los embriones se posicionan pueden ocasionar el desarrollo anormal del embrión, abortos espontáneos y otras complicaciones del embarazo como la placenta previa (Bulletti y Ziegler 2006; Chen *et al.* 2011; Lim y Wang 2010).

Comprender la señalización adrenérgica y la regulación de la actividad contráctil uterina permitiría explorar los valores clínicos de fármacos adrenérgicos que optimicen el tono miometrial, especialmente en momentos previos a la implantación embrionaria.

4.2 Implantación

Para que ocurra la implantación embrionaria es crucial que el blastocisto se vuelva competente y el endometrio se encuentre receptivo durante la "ventana de implantación" (Paria y Dey 1993; Karizbodagh *et al.* 2017); proceso que requiere un diálogo sincronizado entre los tejidos maternos y los embrionarios (Simon *et al.* 2000).

El proceso de implantación se puede subdividir en fases delineadas por los tipos de interacciones presentes entre el trofoblasto y el endometrio (Schlafke y Enders 1975; Kim *et al.* 2017). Si bien los tiempos en los que ocurre y su duración varía entre las especies, éste puede ser subdividido en 3 fases: aposición, adhesión e invasión. En aquellos animales que presentan placentación epiteliocorial, se produce solo la aposición y la adhesión, es por ello que los embriones que se desarrollan en el lumen uterino. En animales con placentas sindesmocoriales, endoteliocoriales y hemocoriales, también se produce la invasión (Pijnenborga *et al.* 1985; Bazer *et al.* 2009) (Figura 11).

Durante la **aposición**, las células trofoblásticas murales del blastocisto se apoyan sobre el epitelio luminal uterino (Armant 2005) y conforme se produce el cierre gradual de la luz uterina, se intensifica el contacto entre ambos (Enders y Schlafke 1967).

Durante la **adhesión**, la superficie apical del trofoblasto mural se adhiere a la superficie del epitelio luminal. En esta etapa se expresan diferentes moléculas de adhesión que funcionan como intermediarias entre el endometrio y el blastocisto, facilitando la fijación

entre ambos(Kimber y Spanswick 2000; Wang y Dey 2006). A continuación, se produce la apoptosis de las células epiteliales luminales, lo que le proporciona al blastocisto acceso a la membrana basal subyacente y a las células deciduales en el sitio de implantación(Fonseca et al. 2012).

La **invasión** ocurre en primates y roedores y, en ellos, representa es la etapa final del proceso implantatorio. Durante la invasión, las células trofoblásticas murales experimentan cambios en la polaridad y en la adhesividad, diferenciándose en células gigantes de trofoblasto primarias (CGTs 1rias). Estas células adquieren características estructurales de células fagocíticas y migratorias e inician la invasión del endometrio (Potts 1968; Fonseca et al. 2012).De esta forma en la fase de invasión el embrión atraviesa el epitelio luminal y se aloja en el estroma endometrial.(Pijnenborg *et al.* 2006).

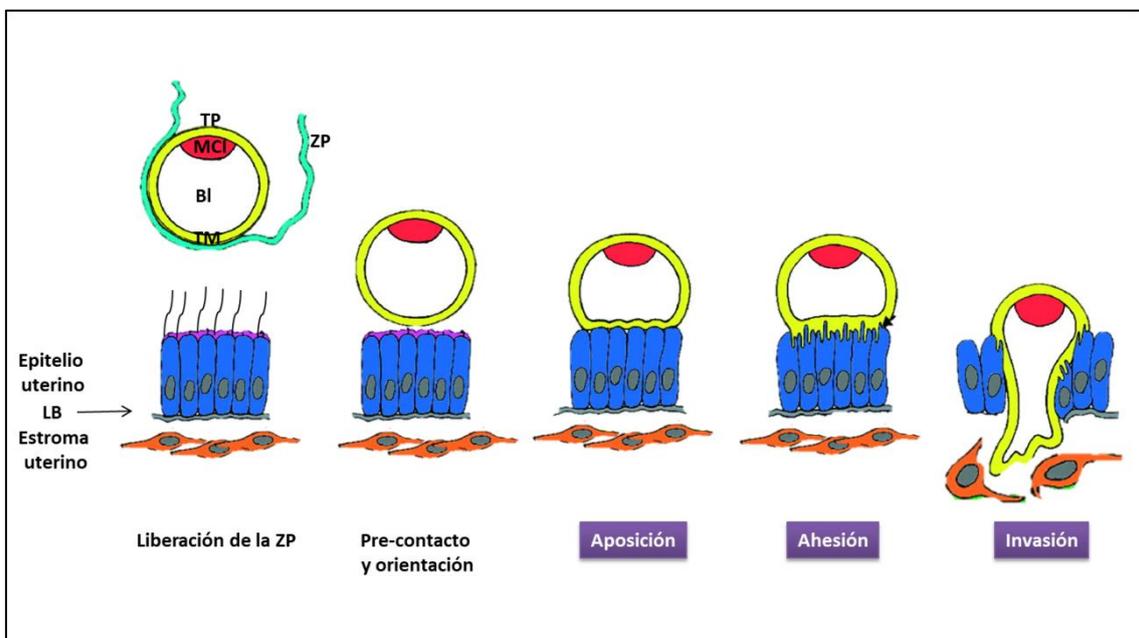


Figura 11: Representación de las etapas que conforman el proceso de implantación del blastocisto murino. Luego de la liberación de su ZP, el blastocisto inicia la orientación y contacto con el epitelio uterino. Le sigue la fase de aposición, en la que el TM se asocia de manera inestable al útero. Prosigue la fase de adhesión, donde la unión entre el TM y el epitelio uterino es firme, surgiendo interdigitaciones entre ambos. La fase final es la de invasión, dónde las células del TE han iniciado su diferenciación a células trofoblásticas invasivas permitiendo al blastocisto la penetración en el epitelio luminal y el estroma uterino. LB: lámina basal, MCI: macizo celular interno, TE: trofoectodermo, TM: trofoectodermo mural, TP: trofoectodermo polar, BI: Blastocele, ZP: zona pelúcida. Modificado de: "Comparative Aspects of Implantation." (Bazer *et al.* 2009).

En la rata, la implantación ocurre en el polo antimesometrial del eje vertical uterino, con el MCI hacia en el lado mesometrial de la cámara de implantación (Wimsatt 1975; Armant 2005; Chen *et al.* 2013).

En humanos, el sitio de implantación se encuentra normalmente en el fundus uterino (Bulletti y Ziegler 2006; Fanchin *et al.* 2009; Chen *et al.* 2013), con el MCI orientado hacia el sitio de implantación.

4.3 Post-implantación

4.3.1 Desarrollo embrionario

Una vez que el blastocisto se ha implantado, se producirá la gastrulación; proceso durante el cual el embrión pasará de ser bilaminar (epiblasto e hipoblasto) a trilaminar (constituido por tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo). A continuación se inicia de la organogénesis, que se manifiesta por la aparición de los pliegues neurales en la zona cefálica (Kaufmann y Bar 1999; Witschi 1962). Durante la misma, cada capa germinal se diferencia y crece para formar los diferentes órganos y sistemas del feto.

Alrededor del día 13.5 de gestación (13.5 gd) comienza el período en el cual los tejidos y órganos fetales maduran y crecen rápida y significativamente (Witschi 1962). De esta forma, el feto crece, se diferencia y madura progresivamente hasta la finalización de gestación, momento en el que ocurre el parto (día 21-22 gd en la rata).

4.3.2 Establecimiento de la interfase materno-fetal

La decidualización es el proceso por el cual las células del estroma uterino forman la porción materna de la placenta, es por ello que resulta fundamental para la prosecución de la gestación. En roedores, la unión con los blastocistos inicia la decidualización de las células fibroblásticas estromales de la zona antimesometrial, dando lugar a la zona decidual primaria (Enders y Schlafke 1967; Fonseca *et al.* 2012); mientras que en la mujer, ésta es producto de la acción de los esteroides ováricos y ocurre en cada ciclo menstrual (Fonseca *et al.* 2012). Con la aparición de la zona decidual primaria, las células estromales circundantes se someten a mitosis, anunciando la formación de la zona decidual secundaria.

La formación de la decidua implica un estrecho equilibrio entre la proliferación y la apoptosis de las células deciduales, lo que resulta crucial para el mantenimiento de la gestación. La decidua antimesometrial alcanza su máximo desarrollo y comienza luego a regresionar. Cuando dicha regresión se completa, se forma la decidua capsular (Fonseca *et al.* 2012; Correia-da-Silva *et al.* 2004).

Pocos días después de la reacción decidual antimesometrial, aparecen en la región central del endometrio las células deciduales mesometriales como resultado de la

diferenciación de las células endometriales del polo mesometrial. Estas células son más pequeñas que las de la decidua antimesometrial, son de forma irregular y contienen un solo núcleo (Fonseca *et al.* 2012).

Las células trofoblásticas que permanecen en el polo mesometrial mantienen su capacidad proliferativa y gradualmente forman una estructura saliente denominada cono ectoplacentario que dará origen a la cara fetal de la placenta.

Posteriormente, las células más periféricas del cono ectoplacentario se diferencian en células gigantes del trofoblasto secundarias (CGTs 2rias) (Simmons y Cross 2005; Fonseca *et al.* 2012). Éstas secretan hormonas, incluidos lactógenos placentarios y factores de proliferación que favorecen la invasión de las arterias uterinas (Adamson *et al.* 2002; Soares *et al.* 2012).

Con el tiempo, se produce un agrandamiento de los vasos sanguíneos adyacentes y la zona central de la decidua mesometrial es invadida por las células trofoblásticas del cono ectoplacentario, lo que resulta en la formación de la placenta definitiva. A continuación, la decidua sufre un proceso de regresión por apoptosis (Correia-da-Silva *et al.* 2004; Fonseca *et al.* 2012), limitando su extensión a una región marginal, que forma el componente materno de la placenta, la decidua basal.

Inicialmente se forma la placenta coriovitelina que es transitoria, siendo fisiológicamente significativa entre la implantación y la mitad de la gestación y se compone de un único tipo de células, las células trofoblásticas gigantes. Por su lado, la placenta corioalantoidea representa la placenta definitiva estableciéndose desde mediados de la gestación (Fonseca *et al.* 2012).

La cara fetal de la placenta inicia su desarrollo y se torna gradualmente más compleja. Estructuralmente, la placenta madura está constituida por la cara fetal, formada por dos compartimentos: el laberinto y la zona de unión, y por la cara materna, formada por la decidua (Figura 15) (Soares *et al.* 2012).

Entre las diversas funciones de la placenta se destacan el anclaje del concepto, la prevención del rechazo del feto por el sistema inmunológico materno, la producción de hormonas y de moléculas de señalización entre la madre y el feto, así como el transporte de nutrientes, desechos y gases entre ambos organismos (Cross 2005; Furukawa *et al.* 2019).

La formación de la placenta es un proceso sensible a las condiciones del medio materno; así, un ambiente uterino adecuado resulta indispensable para el correcto proceso de placentación que influirá en el desarrollo intrauterino de la descendencia como así también en su estado de salud postnatal. Se ha visto que dicho proceso sufre profundas alteraciones frente a un entorno de malnutrición, hipoxia, hipertensión, inflamación y diabetes (Soares *et*

al. 2012). En particular, diversos estudios han demostrado que la obesidad impacta negativamente en el desarrollo placentario y en su funcionalidad (Elia *et al.* 2015; Olson *et al.* 2019). En relación a ello, la obesidad resulta un factor de riesgo en el desarrollo de macrosomía fetal; siendo esto un indicio más de que la fisiología placentaria se ve alterado por esta patología (Breckenkamp *et al.* 2019; Araujo *et al.* 2017). Esto no es un hecho menor, dado que la macrosomía fetal se asocia con numerosas complicaciones tanto de índole materna como fetal.

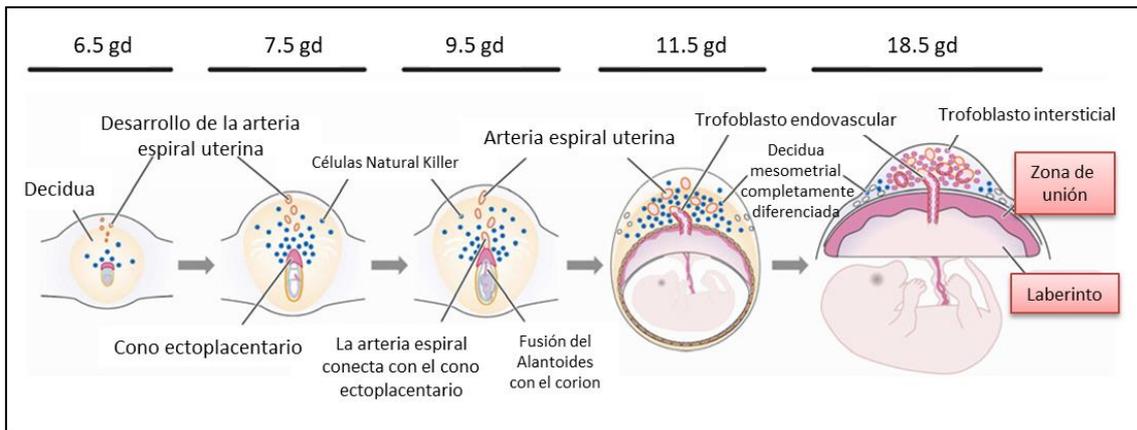


Figura 12: Eventos principales durante la placentación en la rata. .En respuesta a la implantación la decidua antimesometrial se desarrolla y luego regresiona alrededor del día 11.5 de gestación (gd; considerando 0.5 gd el día del apareo). La decidua mesometrial se desarrolla al mismo tiempo y junto al cono ectoplacentario dan lugar a la placenta definitiva. En la placenta madura se distingue su cara materna y fetal (zona de unión y laberinto). Modificado de: “*Rat Placentation: An Experimental Model for Investigating the Hemochorial Maternal-Fetal Interface.*” (Soares *et al.* 2012).

Hipótesis y Objetivos

Con el presente trabajo se aspiró a mejorar comprensión de los principales factores reguladores del posicionamiento embrionario en el útero materno, así como también su rol en patologías que afectan reproducción, como es el caso de la obesidad. Además, se pretendió lograr un mejor conocimiento de cómo la obesidad modifica el ambiente uterino y su consecuente impacto sobre la gestación. La mejor comprensión de los alcances de la obesidad sobre la biología reproductiva femenina, sobre la salud individual y la de su descendencia, debiera facilitar, potencialmente, el hallazgo de terapéuticas a ser utilizadas en el tratamiento/prevenición de dicha patología.

Por todo lo hasta aquí expuesto y debido, entonces, a la alta incidencia de obesidad existente en la actualidad y a su asociación con la ocurrencia de problemas reproductivos, el objetivo general del presente trabajo de tesis fue ***evaluar si la obesidad afecta el desempeño reproductivo femenino y si el mecanismo a través del cual lo hace involucra alteraciones en el ambiente intrauterino y/o en el proceso de implantación embrionaria. Además, se propuso evaluar los mecanismos involucrados en dichas disrupciones.***

De acuerdo a todo lo expuesto anteriormente, se planteó la siguiente hipótesis de trabajo:

“La obesidad adquirida antes de la concepción altera el ambiente intrauterino impactando negativamente sobre su funcionalidad y el desarrollo embrionario y/o fetal”

Para poner a prueba dicha hipótesis, los objetivos específicos planteados fueron los siguientes:

Objetivo específico 1: Evaluar de qué manera la obesidad inducida por dieta de cafetería afecta el metabolismo de ratas hembras **(Cap I)**

Objetivo específico 2: Evaluar si la obesidad inducida por dieta de cafetería afecta el desempeño reproductivo de ratas hembras **(Cap II)**.

Objetivo específico 3: Determinar si la obesidad materna pre-concepcional genera alteraciones que alteren el desarrollo de la gestación **(Cap II)**.

Objetivo específico 4: Analizar si el ambiente intrauterino se ve afectado como consecuencia de la obesidad **(Cap. II y III)**.

Objetivo específico 5: Evaluar la expresión de los diferentes tipos de adrenoreceptores en el útero de la rata, evaluando, además, el efecto que la obesidad ejerce sobre ellas **(Cap. II y III)**.

Objetivo específico 6: Analizar si la obesidad genera alteraciones en la señalización del receptor adrenérgico β_2 uterino **(Cap. II y III)**.

Objetivo específico 7: Examinar si la obesidad genera alteraciones en la peristalsis uterina **(Cap. II y III)**.

Objetivo específico 8: Determinar si la obesidad materna pre-concepcional genera alteraciones en la descendencia **(Cap II)**.

Materiales y Métodos

1 Animales

Se utilizaron ratas hembras pre-púberes (21 a 23 días de edad) de la cepa Wistar que fueron obtenidas y mantenidas en el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN) - Universidad de Buenos Aires (UBA), bajo condiciones controladas de luminosidad (12 horas luz, 12 horas oscuridad) y temperatura (22°C-23°C).

Todos los protocolos desarrollados fueron realizados de acuerdo con las Normativas de Cuidado y Uso de Animales aprobadas por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAL-FCEyN-UBA, protocolo experimental N°23) de acuerdo con la última edición de la guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del National Institutes of Health (NIH), USA.

2 Establecimiento del modelo experimental de obesidad inducida por la dieta

Con el objeto de establecer el modelo de obesidad, 90 ratas fueron divididas al azar en 2 grupos experimentales: control y obeso.

Todos los animales recibieron agua y alimento ad libitum durante todo el protocolo dietario.

El Grupo control estuvo constituido por 43 ratas a las que se les administró dieta estándar (Purina Rat Chow, ACA Nutrición Animal, Argentina; Valor energético: 3.3 Kilocalorías/g; Composición: 11.4% de grasas, 71.4% de carbohidratos, 17.2% de proteínas).

El Grupo obeso estuvo constituido por 47 animales a los que se les administró alimento estándar junto con dieta de cafetería (CAF; Lípidos 42.87 %, Proteínas 30.33 %, Hidratos de carbono 26.8 %, valor energético promedio 4,35 Kilocalorías/g). Esta consistió en ofrecerle a los animales: galletitas de chocolate y vainilla, maní, salchichas, queso, chizitos y papas fritas. Cada uno de estos alimentos fue ofrecido diariamente, variándolo cada dos días. Este modelo animal de obesidad fue descrito originalmente por otros autores (Akyol *et al.* 2009; Sampey *et al.* 2011), es actualmente muy utilizado y ha sido previamente implementado con éxito en nuestro laboratorio. Previamente hemos demostrado que, en nuestras condiciones experimentales, todos los animales que reciben CAF generan un incremento significativo del peso corporal luego de 60 días de protocolo dietario (Bazzano *et al.* 2015; Bazzano *et al.* 2017; Bazzano *et al.* 2018). Es por ello que el protocolo dietario fue administrado por 60 días en este trabajo de tesis; durante los cuales se realizaron las siguientes determinaciones:

2.1 Evaluación de la ingesta alimentaria

Durante los 60 días de protocolo dietario, y a fines de determinar si CAF genera hiperfagia voluntaria, se evaluó la ingesta alimentaria. Para ello, se calculó la diferencia entre el peso de alimento ofrecido y el remanente no consumido. Estos datos fueron utilizados, junto con la información nutricional provista por los productores de cada alimento, para calcular la ingesta calórica de los animales.

2.2 Evaluación del peso corporal y circunferencia abdominal

Durante todo el protocolo dietario, el peso y el largo corporal de los animales y la circunferencia abdominal fueron evaluados dos veces por semana.

2.3 Evaluación del ciclo estral

Durante los últimos 10 días de protocolo dietario, todas las mañanas se realizó la técnica de citología vaginal exfoliante a fines de conocer la fase del ciclo estral en la que se encontraban las hembras. Para ello se extrajo el mucus vaginal y se lo extendió sobre un portaobjetos que fue posteriormente observado utilizando un microscopio óptico (Olympus CHK2-F-GD).

El diagnóstico de las diferentes fases del ciclo estral se realizó evaluando los diferentes tipos celulares presentes en cada extendido y la abundancia relativa de cada uno de ellos. Brevemente, se consideró que el animal cursaba el estadio de diestro cuando la mayoría de las células presentes en el extendido eran leucocitos y presentaba una cantidad mínima de células nucleadas (parabasales e intermedias). El estadio de proestro se determinó cuando se halló que las células epiteliales nucleadas (parabasales e intermedias) eran mayoritarias. La fase de estrus se evidenció cuando las células de tipo epiteliales cornificadas (superficiales y queratinizadas) eran mayoritarias. Finalmente, el metaestro se determinó al observar una cantidad mayoritaria de leucocitos y poca cantidad de células nucleadas y cornificadas.

3 Diseño Experimental

Una vez establecido el modelo de obesidad, los animales fueron separados para dos estudios diferentes como se grafica en la figura 13: (1) Efecto de la obesidad sobre el ambiente uterino pre-concepcional; y: (2) Impacto de la obesidad sobre el desarrollo de la gestación.

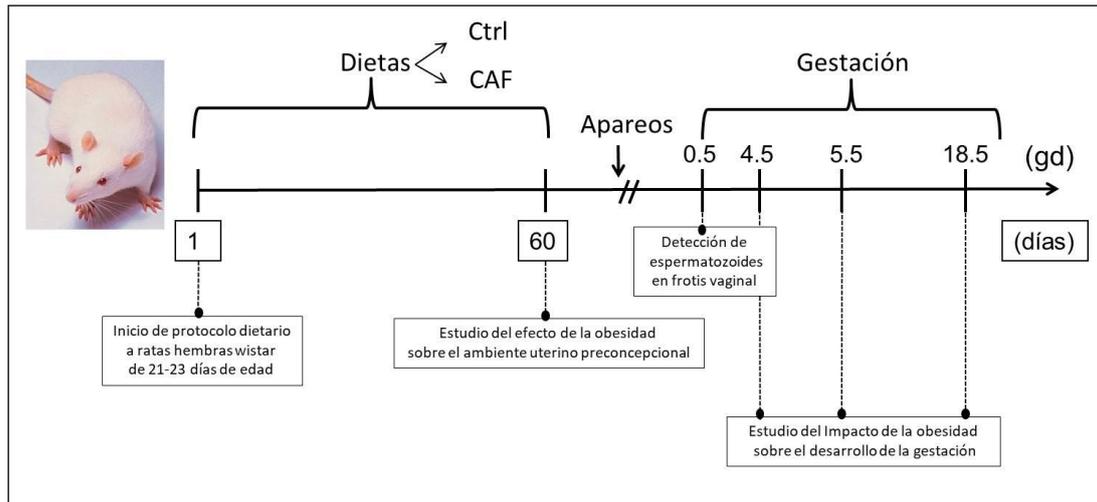


Figura 13: Diseño experimental utilizado; ratas hembra Wistar fueron alimentadas, durante 60 días, bajo dos dietas diferentes: control (Ctrl) y cafetería (CAF). Un grupo de animales fue destinado al estudio del efecto de la obesidad sobre el ambiente uterino pre-concepcional, sacrificándolos en la fase estro inmediatamente posterior al 60vo día de protocolo dietario. En ese momento, otro grupo de ratas fue colocado en apareo a fines de evaluar el desarrollo de la gestación. El apareamiento fue confirmado por la detección de espermatozoides en los extendidos vaginales; considerándose ese día como 0.5 de gestación (0.5 gd). Las ratas fueron sacrificadas en diferentes etapas de la gestación: pre-implantación (4.5 gd), post-implantación temprana (5.5 gd) y gestación tardía (18.5 gd).

4 Obtención de muestras para el estudio del efecto de la obesidad sobre el ambiente uterino pre-concepcional

Las ratas fueron sacrificadas en el primer estro posterior al 60vo día de protocolodietario (Figura 13) a fines de garantizar que las diferencias encontradas en los parámetros evaluados sean consecuencia de la obesidad y no de la fase del ciclo reproductivo en la que los animales se encontraran. A continuación, se extrajeron los úteros, registrándose su peso. El índice útero/somático fue calculado relativizando el peso uterino al peso corporal de cada animal.

Algunos úteros fueron conservados a -80°C para la posterior extracción de proteínas y ARN, otros fueron fijados para su posterior procesamiento histológico; mientras que un tercer grupo fue utilizado inmediatamente para evaluar *ex vivo* la incorporación de glucosa (véase página 50) y la actividad contráctil uterina (véase página 51).

5 Análisis del impacto de la obesidad sobre el desarrollo de la gestación

5.1 Apareos

Como se esquematiza en la figura 13, las ratas destinadas a este estudio fueron colocadas en cohabitación con machos de fertilidad probada (1:1) durante la mañana del proestro inmediatamente posterior al 60^{vo} día de protocolo dietario. Las mañanas

subsiguientes se realizaron extendidos vaginales hasta que el apareamiento se confirmara por presencia de espermatozoides en el frotis, momento que fue considerado como el día 0.5 de gestación (0.5 gd). Las ratas fueron sacrificadas en diferentes etapas de la gestación: pre-implantación (4.5 gd), post-implantación temprana (5.5 gd) y gestación tardía (18.5 gd).

5.2 Evaluación del rendimiento reproductivo

El rendimiento reproductivo se evaluó utilizando parámetros históricamente utilizados para tal fin (Supriya y Reddy 2015): el índice de apareamiento se calculó como el porcentaje de hembras que se aparearon (presentaron espermatozoides en sus frotis vaginales) sobre el total de hembras cohabitadas y el índice de fecundidad como el porcentaje de hembras preñadas sobre el total hembras cohabitadas. Además, se registró el tiempo de concepción como el número de días después del inicio de la cohabitación hasta el apareamiento. El porcentaje de pérdida post-implantacionales se calculó como la diferencia entre el número de sitios de implantación (SI) y el número de fetos viables sobre el total de SI, evaluados en 18.5 gd.

5.3 Monitoreo de la gestación avanzada

Para ello se utilizaron ratas control y obesas en 18.5 gd. Los úteros de las hembras gestantes fueron disecados, se removió el tejido adiposo adyacente y se realizó una incisión a lo largo de la línea antimesometrial. Se separaron las unidades feto-placentarias (UFP) y los fetos fueron expuestos constatando su viabilidad. Luego, se contabilizaron SI viables y reabsorbidos en cada cuerno uterino; registrándose, finalmente, el peso corporal fetal y el de sus respectivas placentas.

5.4 Monitoreo de la gestación durante la post-implantación temprana

En la rata la implantación embrionaria ocurre en la mañana del día 5 de gestación (gd 5) siendo la aparición de los SI la primer señal macroscópica de este evento (Kennedy y Lukash 1982).

Con el objeto de analizar el efecto de la obesidad materna en momentos inmediatamente posteriores a la implantación, ratas en 5.5 gd fueron anestesiadas e inyectadas de manera intravenosa con 0.1 ml de una solución 1% de colorante Azul de Chicago en solución salina (Chen *et al.* 2011). Este es un colorante vital que se une a las proteínas plasmáticas. Esta propiedad permite la visualización de los SI de un color azul intenso dado que éstos presentan un aumento de la permeabilidad vascular. Transcurridos 5 minutos, los animales fueron sacrificados y el útero de cada animal fue disecado de la cavidad abdominal.

Éstos fueron fotografiados y, a continuación, se midieron las distancias entre SI adyacentes (distancia intersitio) utilizando el programa Image J (versión 1.42q, Instituto Nacional de Salud, EE UU). Dichas distancias fueron relativizadas a la longitud del cuerno uterino en el que se encontraban.

La comparación de las distancias intersitio relativas permitió comparar estadísticamente el espaciamiento intrauterino de los SI entre el grupo control y obeso.

5.5 Monitoreo de la gestación previamente a que ocurra la implantación embrionaria

5.5.1 Evaluación de los embriones

Con el objeto de analizar el efecto de la obesidad materna pre-concepcional sobre el desarrollo embrionario y la distribución embrionaria intrauterina e intratubárica en momentos previos a la implantación, se evaluó la distribución intrauterina embrionaria el 4.5 gd. Para ello, úteros y oviductos de ratas en 4.5 gd fueron disecados y se los colocó en placas de Petri conteniendo medio Krebs-Ringer. Se realizaron lavados (‘flushings’) utilizando medio Krebs-Ringer conteniendo 0,3% de albúmina de suero bovino (BSA) y agujas de 25 G acopladas a jeringas de 1 ml; expulsándose así los embriones desde el interior de la cavidad uterina/oviductal a la solución de lavado.

Los embriones recolectados fueron lavados en medio Krebs-Ringer – BSA 0,3% para ser observados y fotografiados, posteriormente, bajo microscopio invertido de contraste de fases.

Los embriones recolectados fueron clasificados, en primera instancia, de acuerdo a su viabilidad. Se consideraron embriones no viables a aquellos con un volumen del 50% o más en estado de lisis respecto de su volumen total. Los embriones viables fueron, a continuación, clasificados de acuerdo al estado de desarrollo en: mórulas (incluyendo mórulas pre-compactadas y compactadas), blastocistos iniciales (cavidad blastocélica ocupando menos del 50% del volumen del embrión), blastocistos expandidos (con cavidad blastocélica completamente expandida) y blastocistos extruidos de la zona pelúcida (Chason *et al.* 2012).

Se registró el número total de embriones en cada estadio y se calculó el porcentaje de embriones de cada estadio respecto del total de embriones contabilizados.

5.5.2 Evaluación de los úteros

Algunos úteros fueron conservados a -80°C para la posterior extracción de proteínas y ARN; mientras que otros fueron utilizado inmediatamente para la evaluación ex vivo de actividad contráctil (véase página 45).

6 Anestesia, analgesia y eutanasia

Los animales fueron anestesiados al inyectarles intraperitonealmente una solución de 50 mg/kg de ketamina (Brouwer, Buenos Aires, Argentina) y 10 mg/kg de xilazina (Alfasan, Woerden, Holanda).

Se extrajo sangre por punción intracardíaca, que fue centrifugada (900 g, 15 minutos) para obtener el suero que posteriormente fue fraccionado y conservados a -80°C hasta su utilización.

La eutanasia se realizó, posteriormente, mediante dislocación cervical.

7 Determinaciones experimentales

7.1 Características metabólicas de los animales

Como se describió anteriormente, la administración de CAF durante 60 días en ratas hembras genera obesidad asociada a hiperglucemia (Bazzano *et al.* 2015). Con el objeto de analizar la naturaleza de esa hiperglucemia, al finalizar el protocolo dietario, se realizaron las siguientes determinaciones:

7.1.1 Prueba de tolerancia a la glucosa (GTT)

Ratas control y obesas con 6 horas de ayuno fueron inyectadas intraperitonealmente con una solución 2g/kg de glucosa. Los niveles de glucosa fueron evaluados utilizando sangre extraída inmediatamente antes de dicha inyección, considerado tiempo 0 (medición basal) y a los 15, 30, 60 y 120 minutos de la misma. Para ello se utilizaron tiras reactivas Accu-Chek Performa II (Roche, Buenos Aires, Argentina).

Los datos se expresaron como la concentración media de glucemia de cada grupo experimental para cada tiempo evaluado. Además, se calculó el área bajo la curva (AUC) de glucemia en función del tiempo como fue descripta previamente (Hsieh *et al.* 2015).

7.1.2 Prueba de tolerancia a la insulina (ITT)

Ratas control y obesas con 2 horas de ayuno fueron inyectadas intraperitonealmente en una dosis de 0,5 U/kg de insulina. Los niveles de glucosa fueron evaluados utilizando sangre extraída inmediatamente antes de dicha inyección, considerado

tiempo 0 (medición basal), y a los 15, 30, 60 y 120 minutos de la misma. Para ello se utilizaron tiras reactivas Accu-Chek Performa II (Roche, Buenos Aires, Argentina).

Los datos se expresaron como la concentración media de glucemia de cada grupo experimental para cada tiempo evaluado. Además, se calculó la constante de velocidad del metabolismo de la glucosa (KITT) estimada como la pendiente de la curva glucemia en función del tiempo durante los primeros 60 minutos (Yao et al. 2014).

7.2 Perfil hormonal

Con el objeto de evaluar si la obesidad afecta el perfil hormonal de los animales gestantes, se midieron las concentraciones séricas de E2 y P4 en animales control y obesos en 18.5 gd.

7.2.1 Estradiol (E2)

La concentración sérica de E2 se determinó utilizando el kit DRG Estradiol ELISA (DRG Instruments GMBH, Germany) siguiendo las indicaciones del proveedor. Brevemente, en cada pocillo de la placa de 96 pocillos se dispensaron 25 µl de cada Standard ó muestra y se los incubó junto con 200 µl de conjugado enzimático por 2 horas a temperatura ambiente. Luego de lavar y secar cuidadosamente, se agregaron 100 µl de sustrato a cada pocillo y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 15 minutos. La reacción fue detenida mediante el agregado de 50 µl/pocillo de solución de detención y se midió la densidad óptica a 450 nm en un lector de microplacas. La sensibilidad del test es de 9.714 pg/ml.

Los resultados se calcularon a partir de una curva patrón obtenida y se expresaron en pg de estradiol /ml.

7.2.2 Progesterona (P4)

Los niveles séricos de P4 se midieron mediante un ensayo de inmunoquimioluminiscencia (ICMA). Brevemente, la unión antígeno (en este caso la P4)-anticuerpo induce la oxidación del éster de acridina, produciendo un producto quimioluminiscente que fue detectado utilizando el sistema de Inmunoensayo UniCel Dxi800. La sensibilidad del ensayo fue de 0,1 ng/ml.

Los resultados se calcularon a partir de una curva patrón obtenida y se expresaron en ng de progesterona/dl.

7.3 Western Blots

Fracciones de úteros extraídos de ratas pre-gestantes (en fase estro del ciclo reproductivo) y de gestantes (en 4.5 gd) fueron homogeneizadas en buffer Tris (NaCl 100 mM, Tris 10 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM, NP40 0,5%, Triton 1%, PMSF 1 mM) al que se le adicionó un cóctel de inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Los homogenatos fueron centrifugados durante 10 minutos a $10\,000 \times g$ a 4°C y se colectaron los sobrenadantes, en los que se determinó la concentración de proteína mediante la técnica de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.). Luego de 5 minutos de hervor, se sembraron $90\ \mu\text{g}$ de proteínas de cada muestra en geles de SDS-poliacrilamida (10%) y se realizó una electroforesis a 100 V durante 1,5 horas. Luego, las proteínas fueron transferidas, durante 1 hora a 4°C , a membranas de PDVF utilizando buffer de transferencia (20% de metanol, vol / vol; 0,19 M de glicina; 0,025 M de Tris-Base, pH = 8,3). A continuación, se bloqueó la membrana con 0.1 % de BSA a temperatura ambiente como se describió previamente (Elia *et al.* 2011).

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: el anticuerpo policlonal anti- $\beta 2$ AR (receptor adrenérgico $\beta 2$) hecho en conejo (1: 1000; Santa Cruz Biotechnology Inc., EE. UU., Sc: 9042), el anticuerpo anti-PPARY (Receptor nuclear activado por proliferadores peroxisomales gamma) hecho en conejo (1:500; Santa Cruz Biotechnology Inc., EE. UU., Sc: 7196) y el anticuerpo monoclonal anti-Glyceraldehido-3-PDH (GAPDH) hecho en ratón (1: 500; Millipore, EE.UU., MAB374) que se usó como control de carga. Todos los anticuerpos fueron incubados durante una noche a 4°C en agitación constante.

Se utilizó el patrón de peso molecular (14.3-200 kDa, Bio-Rad), que permitió la identificación de las bandas de interés: $\beta 2$ AR (56-85 kDa), PPARY (54/57 kDa) y GAPDH (38 kDa).

Los controles negativos se realizaron omitiendo los anticuerpos primarios y se corroboró la ausencia de banda en dichos pesos moleculares.

Posteriormente, las membranas fueron incubadas durante 1 hora con anticuerpos secundarios conjugados con biotina: IgG anti-conejo (1: 2000; Millipore) o anti-ratón (1: 500; DakoCytomation, EE. UU., Eo-354) según correspondiese, seguido de una incubación con el complejo estreptavidina-peroxidasa (HRP) (1:2000; DakoCytomation) durante 45 minutos a temperatura ambiente.

Las señales específicas se visualizaron usando la solución de detección ECL (Thermo Scientific, Illinois, EE. UU.) y fueron adquiridas utilizando Image Quant RT ECL (General Electric, Amersham Bioscience, Argentina). Las bandas obtenidas fueron cuantificadas

densitométricamente utilizando el software Image J (versión 1.42q, Instituto Nacional de Salud, ESTADOS UNIDOS).

Los resultados se expresaron como la intensidad de la proteína de interés (β 2 AR o PPAR γ) normalizados la de GAPDH.

7.4 *Análisis de la expresión génica*

7.4.1 *Extracción de ARN*

El contenido total de ARN fue extraído de los úteros (pre-gestantes y en 4.5 gd) utilizando TRIZOL (Invitrogen, CA, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, los úteros fueron homogeneizados en 1 ml de Trizol e incubados por 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 200ml de cloroformo, se incubó por 3 min y se centrifugó a 12000g por 15 minutos a 4°C. La fase acuosa conteniendo el ARN, fue transferida a otro tubo y precipitada utilizando 600 μ l de isopropanol y centrifugando a 12000 g por 10 minutos a 4°C. El ARN precipitado fue lavado con etanol 75 %, se lo dejó secar durante 1 a 2 minutos y, e inmediatamente a continuación, fue resuspendido en 30 μ l agua libre de ARNasas.

Se calculó la concentración y calidad del ARN obtenido midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm. Luego, las muestras fueron fraccionadas y almacenadas a -80°C para ser utilizadas, posteriormente, en la retrotranscripción.

7.4.2 *Retrotranscripción*

El ADNc se sintetizó incubando 2 μ g de ARN extraído en un buffer conteniendo 3U AMV transcriptasa inversa (Promega, Madison, WI, EE. UU.), 1 μ M oligo d(T)15 Primer (Dongsheng Biotech, Guangdong, China) y 1Mm de mezcla dNTPS (Dongsheng Biotech). La mezcla de reacción se incubó durante 60 minutos a 42°C, seguido de 15 minutos a 70°C y, luego, la reacción se detuvo al colocar los tubos en hielo.

Las muestras de ADNc obtenidas se conservaron a -80°C hasta la realización de la reacción en cadena de la polimerasa correspondiente.

7.4.3 *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*

Las PCR se realizaron utilizando alícuotas de ADNc, buffer y cebadores (primers) específicos (Tabla 1) bajo las siguientes condiciones: 0,5 U de Taq-ADN polimerasa (Invitrogen), 0,2 mM de cada primer (Invitrogen), 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂.

El número de ciclos óptimos se determinó para cada par de primer, de modo que las señales estuvieron siempre en la parte exponencial de la curva de amplificación. Cada ciclo consistió en: desnaturalización a 95 ° C durante 15 segundos, hibridación de los primers a

la temperatura específica de cada uno (Tabla 1) durante 30 segundos y extensión a 72° C durante 15 segundos.

| Gen | Secuencia de los primers (5'-3') | Tamaño de la secuencia (pares de bases) | Temperatura de hibridación (°c) | Ciclos no. | Número de acceso de GenBank |
|--------------------------------|----------------------------------|---|---------------------------------|------------|-----------------------------|
| <i>Glut-4</i> | F: ACTGGCGCTTTCACTGAACT | 106 | 55 | 40 | NM_012751 |
| | R: CGAGGCAAGGCTAGATTTTG | | | | |
| <i>Glut-1</i> | F: TGGCCAAGGAACACACGAATACTGA | 105 | 56 | 40 | NM_138827.1 |
| | R: TGGAAAGAGACAGGAATGGGCGAAT | | | | |
| <i>InsR</i> | F: ATCCGTCGCTCCTATGCTCTGGTGT | 279 | 64,5 | 40 | NM_017071 |
| | R: GTTGGTCTTCAGGGCAATGTCGTTC | | | | |
| <i>GAPDH</i> | F: CCATCAACGACCCCTTCATT | 110 | 57 | 35 | NM_017008.4 |
| | R: GACCAGCTTCCCATTCTCAG | | | | |
| <i>L30</i> | F: CCATCTGGCGTCTGATCTT | 200 | 58 | 35 | NM_022699.3 |
| | R:GGCGAGGATAACCAATTC | | | | |
| $\alpha 1A$ AR | F:TCTTCCTAGTGATGCCCATTTG | 145 | 55,35 | 40 | NM_017191 |
| | R:GCTTTCTTGAACCTCTGGCTG | | | | |
| $\alpha 1B$ AR | F:CCTGTTCTCCACCCTAAAGC | 140 | 55,05 | 40 | NM_016991 |
| | R:ACCCAAGGATACGCATGAAG | | | | |
| $\alpha 1D$ AR | F:AAAAGGCTGCCAAGACGT | 133 | 55 | 40 | NM_024483 |
| | R:AAGATGACCTTGAAGACACCC | | | | |
| $\alpha 2A$ AR | F:GCGAGATCTACTTGGCCCTC | 258 | 57 | 40 | NM_012739.3 |
| | R:CGTTAATCTTGCACTCGGC | | | | |
| $\alpha 2B$ AR | F:GTCTTCAACCAGGACTTCCG | 147 | 55,6 | 40 | NM_138505.2 |
| | R:AGAGACTGTGGAGGTGGG | | | | |
| $\alpha 2C$ AR | F:TTCAAGCACATCCTCTCCG | 143 | 55,3 | 40 | NM_138506.1 |
| | R:GAACCTGGGAGAAGCCACAC | | | | |
| $\beta 1$ AR | F:CTGCTACAACGACCCCAAG | 146 | 54,2 | 40 | NM_012701.1 |
| | R:TCTTACCTGTTTCTGGGC | | | | |
| $\beta 2$ AR | F:GTACTGTGCCTAGCCTTAGC | 118 | 58 | 40 | NM_012492.2 |
| | R:GGTTAGTGTCTGTGAGGGAGG | | | | |
| $\beta 3$ AR | F:AGAACTCACCGCTCAACAG | 137 | 54,65 | 40 | NM_013108.2 |
| | R:CATGGACGTTGCTTGTCTTTC | | | | |
| <i>Hif1α</i> | F: CCTACTATGTCGCTTCTTGG | 185 | 52 | 35 | NM_024359.1 |
| | R: TGTATGGGAGCATTAACTTAC | | | | |
| <i>LPA₃</i> | F: GACGGCCTGAACTGCAAGC | 144 | 54 | 40 | NM_023969.1 |
| | R: GCAGATCATCTTCCGCATGG | | | | |

Tabla 1: Especificaciones de los primers utilizados.

Para la realización de los controles negativos, agua libre de nucleasas fue utilizada en lugar de cDNA; y como control interno se utilizó el gen de expresión constitutiva GAPDH. En el caso del screening de los RA, se realizaron controles positivos que consistieron en una mezcla de ADNc extraído de cerebro, hígado, riñón y músculo que cubre la expresión de todos los miembros de la familia de RA.

Los productos de PCR fueron sembrados en geles de agarosa 2% (Biodynamics, Buenos Aires, Argentina) y sometidos a electroforesis (30 minutos, 110V). Se utilizaron patrones de peso molecular que permitieron la identificación de las bandas de interés. Dichos geles fueron fotografiados utilizando ImageQuant RT ECL (General Electric).

Para el screening de RA se evaluó la presencia o ausencia de banda, mientras que para Hif1 α , Gluts 1 y 4, el InsR y LPA₃ se cuantificó la densidad de cada banda utilizando el software Image J (versión 1.42q, Instituto Nacional de Salud, EE. UU.).

La densidad de las bandas de interés se normalizó a la de *GADPH* en cada muestra. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias (u.a.) del ARN que codifica para el gen en estudio respecto de GAPDH.

7.4.4 PCR en tiempo real (qPCR)

La qPCR fue utilizada para cuantificar la expresión génica de β 2 AR en úteros de ratas control y obesas pre-gestantes y en 4.5 gd.

Para las qPCR se utilizaron alícuotas de ADNc, primers específicos para el β 2 AR (Tabla 1) en una concentración final de 0,9 μ M y una Master Mix (Universal SYBR Green Master Mix; Roche Applied Science) que contiene ADN polimerasa, dNTPs, el buffer de reacción y SYBR Green (indicador de fluorescencia que permite la cuantificación de los niveles de amplicones).

Los controles negativos se realizaron utilizando agua libre de nucleasas en lugar de las muestras de ADNc; y como control interno se utilizó el gen de expresión constitutiva L30.

Para todos los pares de primers, se probaron distintas diluciones de ADNc, eligiendo aquellas que presentaban un Ct (del inglés cycle threshold, ciclo en el cual la fluorescencia de cada muestra supera una fluorescencia umbral) menor a 35 y una diferencia menor a 10 Cts entre el gen de interés y el de referencias.

Siempre se verifico que la eficiencia de reacción en cada muestra sea cercana a 2 (situación ideal en la cual los productos de PCR se duplican luego de cada ciclo de amplificación) y que además no se generaran dímeros.

Para todas las reacciones se utilizó un termociclador Opticon 2 del Motor de ADN Cyler de Tiempo real y para las amplificaciones se utilizó el protocolo recomendado por el fabricante: una etapa inicial de activación de la polimerasa a 94°C durante 10 min, seguida de 40 ciclos de 30 seg a la temperatura de hibridación de cada primer y 60 seg a 72°C, seguidos de un último ciclo de elongación a 72°C por 10 min.

Los datos fueron analizados según el método de curva estándar. Ésta fue realizada utilizando concentraciones decrecientes del ADNc de las distintas muestras. Finalmente, la expresión génica de β 2 AR que presentó cada muestra fue relativizada a la de L30 en la misma muestra.

7.5 *Procesamiento del tejido uterino para la realización de técnicas histológicas*

Fracciones uterinas que habían sido fijadas utilizando formol 4% (pH 7) durante 24 horas, fueron deshidratadas utilizando concentraciones crecientes de etanol (80°, 90°, 96° y 100°), aclaradas en xilol e incluidas en parafina. A continuación, se realizaron cortes histológicos de 7µm utilizando un micrótopo de rotación, que fueron montados en portaobjetos para la posterior realización de coloraciones, inmunohistoquímicas e inmunofluorescencias.

7.5.1 *Coloración Tricrómico de Masson*

Secciones de la porción media de los cuernos uterinos fueron desparafinadas con xilol y rehidratadas con concentraciones decrecientes de alcohol, seguido de agua destilada. A continuación, se realizó la coloración Tricrómico de Masson; comenzando la coloración con un pasaje rápido por hematoxilina diluida en PBS y posterior lavado con agua corriente. Luego se coloreó con Fucsina Ponceau de Xilidina durante dos minutos y se lavó con agua destilada. Finalmente se aplicó el Ácido Formolíbido 1% durante 4 minutos, el cual actúa como mordiente del colorante Azul de Anilina Acética que fue agregado inmediatamente después durante 4 minutos. Luego de un lavado en agua destilada, se deshidrató el tejido en una serie de alcoholes de gradación creciente, seguidos de xilol para finalmente realizar su montaje en medio anhidro.

Los cortes histológicos coloreados fueron observados bajo microscopio óptico de campo claro y fotografiados para el posterior análisis.

7.5.2 *Estudio de la histología uterina*

El análisis histológico del tejido endometrial y miometrial fue realizado utilizando las fotografías tomadas de las secciones uterinas coloreadas con tricromico de Masson, y el programa J (versión 1.42q, Instituto Nacional de Salud, EE. UU.)

Por un lado se realizó una morfometría, evaluando el grosor endometrial (midiéndose la distancia entre el epitelio luminal y el miometrio) y el grosor miometrial (distancia desde el comienzo de la musculatura longitudinal hasta el mesotelio peritoneal). Los resultados fueron expresados en unidades arbitrarias (u.a).

Por otro lado, se realizó el análisis histopatológico utilizando el criterio de Scully, según el cual, las glándulas uterinas son clasificadas en cuatro tipos: (i) Glándulas normales: son de tipo tubulares simples, que en secciones pueden aparecer circulares, ovaladas o elongadas con lumen angosto y sin ramificaciones ni glándulas hijas; (ii) Glándulas quísticas:

son de tipo circulares de gran tamaño; (iii) Glándulas con glándulas hijas: pueden ser de varios tamaños y formas (circulares, elongadas o tortuosas) con glándulas hijas formadas o en formación o glándulas dentro del epitelio o dentro del lumen de la glándula madre, o sobre la superficie externa de la glándula madre (como un brote) (iv) Glándulas formando conglomerados: presentan una arquitectura compleja en las cuales cada glándula está cerca de las demás sin estroma entre ellas y presentan numerosos lúmenes que las interconectan. Pueden desarrollarse a partir de glándulas hijas.

Además, se evaluó el tipo de epitelio (simple, pseudoestratificado y estratificado) que presentaban las glándulas endometriales. Tanto el epitelio estratificado como las glándulas con glándulas hijas (iii) y las que forman conglomerados (iv) son considerados indicadores de posible desarrollo de malignidad en el endometrio (Scully RE *et al.* 1994; Gunin *et al.* 2001).

7.5.3 Inmunofluorescencia

Secciones uterinas de animales en pre-gestación y en 4.5 gd fueron desparafinadas con xilol y rehidratadas utilizando concentraciones decrecientes de alcohol, seguido de un pasaje por PBS. Luego, se realizó la recuperación de antígeno por calor, colocando las secciones en una solución de 0,01 M de buffer citrato, pH 6,2 durante 10 minutos a temperatura sub-ebullición. A continuación se bloqueó contra inespecíficos mediante la incubación con 5% (m/v) de leche a temperatura ambiente durante 40 minutos. El control negativo de la inmunofluorescencia se realizó omitiendo el anticuerpo primario.

Como fue descripta previamente por otros autores (Chen *et al.* 2011), para la detección uterina del $\beta 2$ AR los cortes fueron incubados a 4°C durante la noche con el anticuerpo policlonal anti- $\beta 2$ AR (H-73) hecho en conejo diluido 1:200 en PBS (Santa Cruz Biotechnology sc: 9042); seguido de un anticuerpo secundario biotinilado anti conejo hecho en cabra (1:1000 en PBS; Millipore) a temperatura ambiente durante 60 minutos. A continuación fueron incubadas por 40 minutos con el complejo estreptavidina-Alexa Fluor 488 (1:500; Molecular Probes) y los núcleos se marcaron con yoduro de propidio (1: 1000; Invitrogen). Finalmente, las secciones se montaron en PBS-glicerol (50:50) y se observaron y fotografiaron utilizando un microscopio Olympus Bx-61 para microscopía confocal láser conectada a una cámara Olympus FV-300.

7.5.4 Inmunohistoquímica contra el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA)

Secciones uterinas de animales en pre-gestación fueron desparafinadas con xilol y rehidratadas utilizando concentraciones decrecientes de alcohol, seguido de un pasaje por PBS. Luego, se realizó la recuperación de antígeno por calor, colocando las secciones en una solución de 0,01 M de buffer citrato, pH 6,2 durante 10 minutos a temperatura sub-ebullición. A continuación, se bloqueó la actividad de las peroxidasas endógenas por incubación en 3% (v/v) de peróxido de hidrógeno a temperatura ambiente durante 15 minutos y el bloqueo de inespecíficos se logró mediante la incubación con 5% (m/v) de leche a temperatura ambiente durante 40 minutos.

El control negativo de la inmunohistoquímica se realizó omitiendo el anticuerpo primario.

Para la detección de PCNA, las secciones de tejido se incubaron a 4°C durante la noche con el anticuerpo primario monoclonal anti-PCNA hecho en ratón (1: 200; Millipore, MAB424). Luego, se incubó a temperatura ambiente durante 40 minutos con el anticuerpo secundario biotinilados anti-ratón (1: 300; DakoCytomation, Eo-354) hecho en cabra. Posteriormente, se realizó la incubación durante 40 minutos con el complejo de estreptavidina-biotina peroxidasa (1: 500; DakoCytomation Cat: D0396); y el desarrollo del color se realizó con una solución conteniendo 3,3'-diaminobencidina (DakoCytomation). Las secciones se contrastaron con hematoxilina y, finalmente, fueron deshidratadas, montadas y observadas utilizando un microscopio de luz FV-300 Olympus.

Se tomaron fotografías para, posteriormente, cuantificar el número de células que presentaban núcleos PCNA positivos presentes en cada compartimento tisular de acuerdo a Lopez y cols. (Lopez Merlo *et al.* 2017). Se analizaron un mínimo de 500 células dentro de 4 cuadrantes por cada sección uterina analizada.

7.6 Evaluación de la incorporación de glucosa por parte de los úteros

La medición de captación de glucosa fue realizada *ex vivo* en úteros de animales pre-gestantes y adaptada de trabajos previos (Sakamoto *et al.* 2005). Brevemente, un cuerno uterino de cada animal fue dividido en dos mitades. Ambas mitades se incubaron durante 50 minutos a 37°C en 1 ml de medio Krebs Ringer Bicarbonato (KRB) (NaCl 118 mM, 1,2 mM KH₂PO₄, 4,7 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 1,17 mM MgSO₄, 25 mM NaHCO₃, 5,6 mM de D-glucosa, pH 7,4) que contenía 2 mM de pituvato.

A una mitad se le adicionó insulina (0,1mU/mL), manteniendo la otra mitad sin éste estímulo. Los tejidos fueron, posteriormente, incubados por 10 minutos a 30°C con KRB conteniendo 1 mM 2-deoxy-D-[1,2-3 H(N)] glucosa (3 mCi) bajo atmósfera conteniendo 95% de O₂ al 5% de CO₂. El transporte de glucosa fue frenado por inmersión de los tejidos en KRB helado que contenía 80 mM de citocalasina B. El tejido se congeló en nitrógeno líquido y se procesó como ha sido descrito previamente (Sakamoto *et al.* 2005).

La 2D-glucosa incorporada por los úteros fue medida en contador de centelleo líquido por duplicado y expresada como $\mu\text{mol/g}$ de proteína/h.

7.7 Análisis de la actividad contráctil uterina

La actividad contráctil uterina se evaluó *ex vivo* tanto en animales pre-gestantes como en gestantes en 4.5 gd utilizando transductores de fuerza isométrica conectados a un amplificador puente, que a su vez estaba conectado a un sistema de adquisición de datos (Software DataStudio, Pasco) como fue descrito previamente por otros autores (Chaud *et al.* 1997)

Brevemente, secciones de miometrio longitudinal de cada cuerno uterino fueron disecadas y colocadas en un baño (Letica, AD Instruments, Oxford, RU) conteniendo Buffer KRB a 37°C bajo atmósfera de 95% O₂ y 5% de CO₂. Cada sección se ajustó a una tensión de reposo de 9,8 Mn y se esperó hasta que se produjeran contracciones fásicas regulares durante 30 minutos (estabilización). Posteriormente, se determinó la actividad contráctil espontánea (basal) durante 20 minutos.

Una vez evaluada la actividad contráctil espontánea, se procedió a evaluar el efecto de Salbutamol sobre la misma. Para ello, las secciones miométricas fueron incubadas con concentraciones crecientes de Salbutamol que fueron adicionadas al medio cada 7 minutos. El rango de concentraciones de Salbutamol evaluadas en úteros de animales en pre-gestación fue 0,05 ng/ml a 5000ng/ml (Parida *et al.* 2013; Chen *et al.* 2011); mientras que para los úteros en 4.5 gd éste fue de 0,05 ng/ml a 500ng/ml debido a la mayor sensibilidad del tejido al agonista en este estadio gestacional.

El análisis de la actividad contráctil fue realizado utilizando el programa Clamp-fit 10.7 con el que se calcularon la amplitud y la frecuencia de las contracciones, así como la actividad integral (área bajo la curva de fuerza en función del tiempo).

8 *Análisis estadístico*

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa GraphPad InStat (software GraphPAD, San Diego, CA, EE. UU.) y el programa R Studio (R statistical software; v. 3.4.3), considerando diferencias significativas cuando se presentara un valor de $p < 0.05$. El número de animales utilizados para cada determinación (n) se indicó en las leyendas de cada figura.

Los resultados se expresaron como media \pm S.E.M (Error estándar de la media) fueron comparados estadísticamente mediante prueba T de Student.

Los valores de frecuencias, expresados como porcentajes, fueron comparados mediante el test Chi-cuadrado.

Las curvas de peso, de tolerancia a la glucosa y de respuesta a insulina, al igual que las de actividad contráctil fueron analizadas utilizando un modelo de análisis de la varianza (ANOVA) de medidas repetidas seguido de la prueba de Newman-Keuls. Cuando se realizaron comparaciones entre alguno de los tiempos analizados respecto de su propio basal se utilizó el test de Bonferroni.

Resultados

Capítulo I: Establecimiento del modelo experimental de obesidad

El objetivo planteado en primer lugar fue establecer el modelo experimental de obesidad inducido por dieta de cafetería (CAF) que fue utilizado para el estudio del efecto de la obesidad sobre el ambiente intrauterino y la gestación. Para ello se trabajó con dos grupos experimentales, los animales control que recibieron alimentación estándar y el grupo obeso que recibió CAF.

Antes de comenzar a administrar las dietas (día 1 del protocolo dietario) se controló el peso corporal de los animales. El peso corporal inicial promedio del grupo control fue de 61.17 ± 1.08 g y el del grupo obeso fue de 60.67 ± 1.69 g, verificándose que el peso corporal promedio era similar en ambos grupos.

Durante el protocolo dietario, se monitoreó diariamente la ingesta alimentaria y calórica, el peso corporal y el tamaño de la circunferencia abdominal de los animales, como se detalla a continuación.

1 La administración de CAF por 60 días genera hiperfagia voluntaria

El consumo de alimentos no difirió entre el grupo control y obeso durante la primera semana de protocolo dietario (Tabla 2). Es por ello que tampoco lo hizo el consumo calórico. En la semana 8, los animales que recibieron CAF consumieron aproximadamente un 40 % más de alimentos que los que recibieron la dieta estándar ($p < 0,001$; Tabla 1); de esta forma la ingesta calórica del grupo obeso resultó 4.5 veces que la del grupo control ($p < 0,001$). Estos hallazgos demuestran la gran aceptación de CAF por parte de los animales y su capacidad de inducir hiperfagia voluntaria en las ratas.

| Parámetro | Control | Obeso |
|--|-------------------|---------------------------|
| Consumo de alimento por animal (g/día) | | |
| Semana 1 | 20.01 ± 2.51 | 26.42 ± 2.72 |
| Semana 8 | 30.3 ± 3.0 | $72.4 \pm 5.0\#; ***$ |
| Consumo calórico por animal (Kcal/día) | | |
| Semana 1 | 62.71 ± 3.33 | 85.81 ± 15.23 |
| Semana 8 | 99.61 ± 13.21 | $322.95 \pm 14.97\#; ***$ |

Tabla 2: Consumo alimentario y calórico diario promedio de los animales del grupo Control y Obeso durante la semana inicial (semana 1) y final (semana 8) de protocolo dietario. Los datos se expresan como la media del consumo diario por animal (gramos/día o bien Kcal/día \pm S.E.M). $n = 20$ /grupo. *** $p < 0,001$ respecto al control y # $p < 0.01$ respecto a sus respectivos valores iniciales.

2 La administración de CAF por 60 días genera obesidad

Con el objeto de evaluar si el aumento en la ingesta alimentaria se veía reflejada en un aumento del peso corporal, se monitoreó diariamente el peso corporal de los animales durante todo el protocolo dietario.

Luego de ser administrada por 60 días, CAF generó un incremento del 22 % en el peso corporal de todos los animales en comparación a los animales que se alimentaron exclusivamente con dieta estándar ($p < 0,05$; Figura 14A). Esto se vio asociado a un incremento en la circunferencia abdominal de los animales del grupo obeso ($p < 0,05$; Figura 14A). Estos resultados demuestran que CAF induce obesidad asociada a un aumento de la adiposidad abdominal luego de ser administrada a ratas por 60 días (Figura 14B).

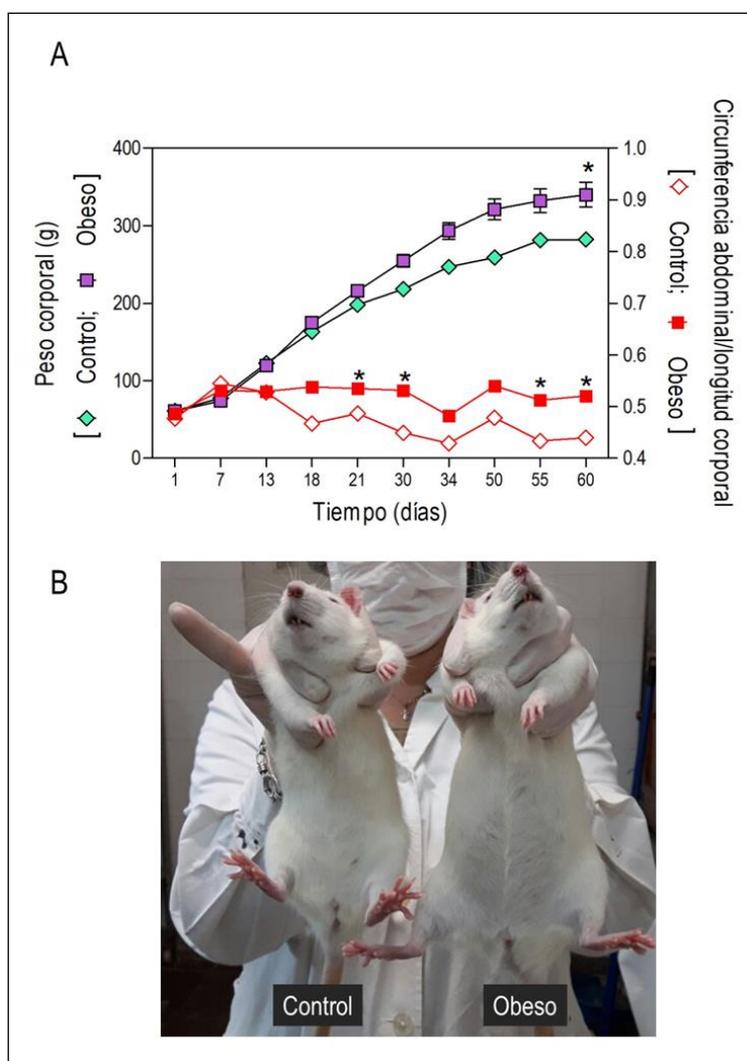


Figura 14: (A) Ganancia de peso corporal y proporción entre la circunferencia abdominal y la longitud corporal de ratas control (rombos) y obesas (cuadrados) a lo largo de los 60 días de protocolo dietario. Los datos se expresan como media \pm S.E.M; n=20/Grupo; * $p < 0.05$ respecto a los controles. (B) Imagen representativa de un animal del grupo control y uno del grupo obeso al cabo de 60 días de protocolo dietario.

3 La obesidad inducida por CAF se asocia con intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina

La concentración de glucosa sanguínea es uno de los principales parámetros de referencia del estado metabólico en los mamíferos; ésta representa la cantidad de energía disponible que tienen los organismos para el mantenimiento de sus funciones vitales (Figueroa-garcía *et al.* 2016).

Hallazgos previos de nuestro laboratorio demostraron que la ingesta de CAF por 60 días produce, en ratas hembras Wistar, el desarrollo de obesidad asociado a hiperglucemia (Bazzano *et al.* 2015). En concordancia con estos hallazgos, la asociación entre obesidad e hiperglucemia, e incluso el desarrollo de diabetes, es frecuentemente observada en la clínica (Abdullah *et al.* 2014).

Por todo lo expuesto, el siguiente objetivo fue analizar el perfil glucémico de animales control y obesos. Para ello, se evaluó la tolerancia a la glucosa y la respuesta a insulina de los animales luego de 60 días de administrado el protocolo dietario.

3.1 Curva de tolerancia a la glucosa

La prueba de tolerancia a la glucosa refleja la capacidad que tiene el organismo de eliminar el exceso de glucosa en sangre. Al realizar dicha prueba (Figura 15), se observó que el grupo control mostró un aumento en la glucemia inmediatamente después de la inyección de glucosa; ésta comenzó a disminuir a los 30 minutos, alcanzando concentraciones similares a las basales transcurridas 2 horas desde la inyección.

Una cinética similar fue observada al evaluar la respuesta de los animales obesos; sin embargo, sus glucemias fueron superiores a las de los controles para todos los tiempos analizados: 0, 15,30 y 60 minutos ($p<0.001$) y 120 minutos ($p<0.05$).

Al analizar el área bajo dichas curvas (AUC), ésta resultó mayor en los animales obesos que en los controles ($p<0.001$, inserto de la Figura 15).

Estos resultados demuestran que CAF administrada por 60 días induce, en ratas hembras, intolerancia a la glucosa asociada a la obesidad.

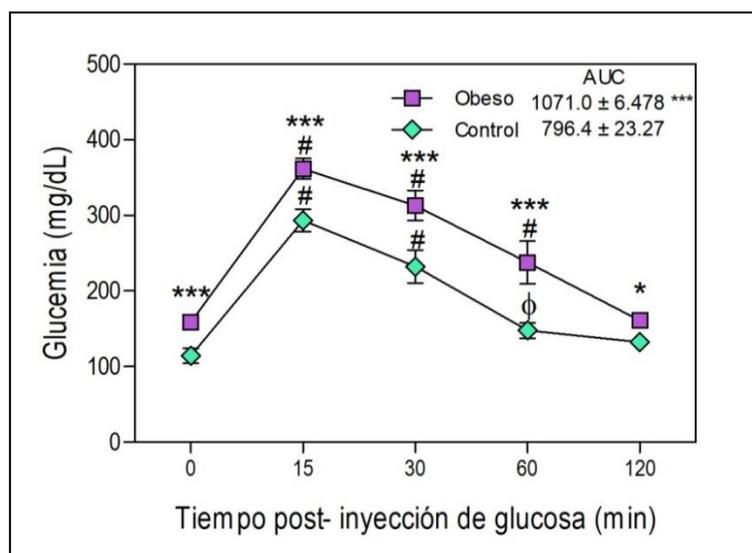


Figura 15: Glucemias evaluadas durante la prueba de tolerancia a la glucosa en animales control (rombos verdes) y animales obesos (cuadrados violetas). La glucosa fue administrada inmediatamente después del tiempo 0. Se calculó el área bajo cada curva (AUC) y su resultado se muestra en el inserto. Los datos se describen como la media \pm S.E.M. ($n = 5/\text{Grupo}$). * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ respecto del grupo de control; # $p < 0.001$ y ϕ $p < 0.01$ respecto del tiempo 0.

3.2 Curva de resistencia a insulina

A fin de determinar si la intolerancia a la glucosa detectada en los animales obesos es consecuencia de una disminución en la sensibilidad a insulina, el próximo objetivo fue evaluar el perfil glicémico de los animales control y obesos ante el estímulo de insulina.

Como se observa en la figura 16, las ratas control mostraron una disminución de su glucemia luego de administrada la insulina, que fue normalizada a las 2 horas de dicha exposición. La velocidad del metabolismo de la glucosa (KiTT) fue estimada como la pendiente de la curva de glucemia en función del tiempo durante esas 2 h. Es por ello que el KiTT resultó negativo en las ratas del grupo control (inserto de la Figura 16).

Las ratas obesas mostraron glucemias superiores a las de los animales control tanto a tiempo 0 ($p < 0.01$) como en todos los tiempos analizados posteriores a la inyección de insulina: 15, 30, 60, 120 ($p < 0.001$) y 150 minutos ($p < 0.05$). La KiTT de los animales obesos no solo fue diferente del de los controles ($p < 0.001$) sino que fue cercano a cero, lo que indica que los animales obesos no respondieron al estímulo de insulina.

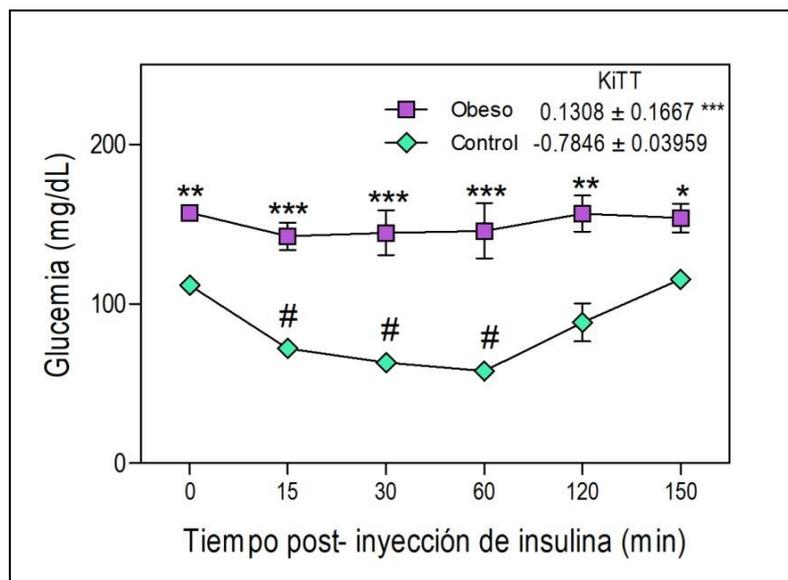


Figura 16: Glucemias evaluadas durante la prueba de respuesta a la insulina en animales control (rombos verdes) y obesos (cuadrados violetas). La insulina fue administrada inmediatamente después del tiempo 0. En el inserto se muestran la velocidad del metabolismo de la glucosa (KiTT) estimada como la pendiente de la curva durante los primeros 60 minutos (min). Los datos se presentan como la media \pm S.E.M. (n = 5/Grupo). * p<0.05, ** p<0.01 y *** p<0.001 respecto del grupo control y # p<0.001 respecto al tiempo 0.

Conclusión Parcial I:

Los resultados hasta aquí expuestos permiten conocer el perfil metabólico de los animales obesos, demostrando que el modelo de obesidad inducido por CAF utilizado en este trabajo de tesis cursa con hiperglucemia, intolerancia a la glucosa e insulino resistencia.

Capítulo II: Impacto de la obesidad pre-concepcional sobre el desarrollo de la gestación

Estudios a nivel clínico han reportado que la obesidad en mujeres se asocia con baja calidad oocitaria y con un aumento de pérdidas embrionarias en comparación con mujeres de peso normal (Moragianni *et al.* 2012). En concordancia con estos hallazgos, en estudios previos en nuestro laboratorio hemos demostrado que la obesidad, inducida en ratas hembras por administración de CAF, genera alteraciones en la función y en la reserva ovárica, efectos que se vieron asociados a ciclos estrales alterados (Bazzano *et al.* 2015; Bazzano *et al.* 2017).

Por todo lo expuesto, el objetivo general de este capítulo fue evaluar si la obesidad inducida por dieta de CAF en ratas y adquirida antes de la concepción genera alteraciones en el desempeño reproductivo y/o en el desarrollo embrionario y/o fetal.

1 La obesidad disminuye las tasas de fertilidad y retrasa la concepción

A fines de evaluar la capacidad reproductiva de las hembras, se evaluaron el índice de apareamiento, de fertilidad y el tiempo hasta lograr la concepción (Tabla 3).

El índice de apareamiento fue del 100% tanto de ratas control como obesas dado que las hembras fueron colocadas en cohabitación con el macho tantas veces como fuera necesario hasta que se verificara el apareamiento. Sin embargo, las ratas obesas requirieron de un mayor número de veces puestas en apareo hasta alcanzar la concepción, es por ello que el tiempo de concepción fue mayor en éstas que en controles ($p < 0,001$). El número de ratas que resultaron efectivamente preñadas fue menor en el grupo obeso que en controles, a pesar de haberse verificado el apareamiento en todas, por lo que la tasa de fertilidad del grupo obeso fue inferior a las de los controles ($p < 0,001$).

Estos resultados demuestran que la obesidad altera el desempeño reproductivo en ratas hembras, asociándose a sub-fertilidad y un retraso en la concepción.

| Parámetro | Control | Obeso |
|------------------------------------|-------------|-----------------|
| N° hembras puestas en cohabitación | 33 | 37 |
| N° hembras que se aparearon | 33 | 37 |
| N° de hembras preñadas | 33 | 27 |
| Tiempo de concepción (días) | 1.40 ± 0.40 | 5.80 ± 1.00 *** |
| Índice de apareo (%) | 100 (33/33) | 100 (37/37) |
| Índice de Fertilidad (%) | 100 (33/33) | 73 (27/37) *** |

Tabla 3: Efecto de la obesidad sobre la capacidad reproductiva de ratas hembras. El índice de apareamiento se calculó como el número de hembras con presencia de espermatozoides en el frotis vaginal / número de hembras cohabitadas × 100. El índice de fertilidad se calculó como el número de hembras preñadas / número de hembras cohabitadas × 100. El tiempo de concepción se determinó contando el número de días desde que se inició la cohabitación hasta la confirmación del apareamiento. Los valores se expresan como la media ± S.E.M o como porcentajes; ***p<0.001 respecto al control.

2 La obesidad pre-concepcional incrementa la ganancia de peso corporal materno durante la gestación.

En aquellas hembras que efectivamente alcanzaron la preñez, se monitoreó diariamente el peso materno durante el transcurso de la gestación hasta el 18.5 gd. En la figura 17 se observa que el peso corporal del grupo obeso fue superior al de los controles durante el transcurso de la gestación, a pesar de que ambos grupos se alimentaron con dieta estándar durante este período. Este resultado demuestra una susceptibilidad al aumento de peso corporal por parte de las gestantes obesas, resaltando la importancia del peso materno al momento de la concepción.

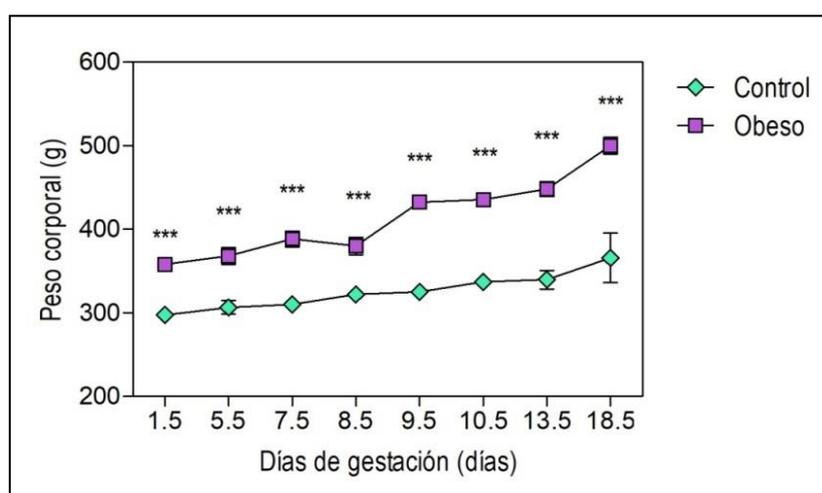


Figura 17: Ganancia de peso corporal (g) de ratas control (rombos verdes) y obesas (cuadrados violetas) durante el transcurso de la gestación. Los datos se expresan como media ± S.E.M; n=20/Grupo;*** p<0.001 respecto a los controles.

3 *La obesidad pre-concepcional genera un incremento en los niveles séricos de Estradiol en gestación avanzada*

La acción de hormonas ováricas Estradiol (E2) y Progesterona (P4) resulta vital para el correcto desarrollo de la gestación, es por ello que se midió la concentración de dichas hormonas en suero de gestantes control y obesas en 18.5 gd.

Los sueros provenientes de animales obesos presentaron una mayor concentración de E2 comparado con los detectados en los animales control (Figura 18A). Por su parte, los niveles séricos de P4 del grupo obeso no difirieron respecto al grupo control (Figura 18B).

A partir de estos resultados se concluye que la obesidad genera un desbalance en el perfil hormonal de las gestantes en gestación avanzada.

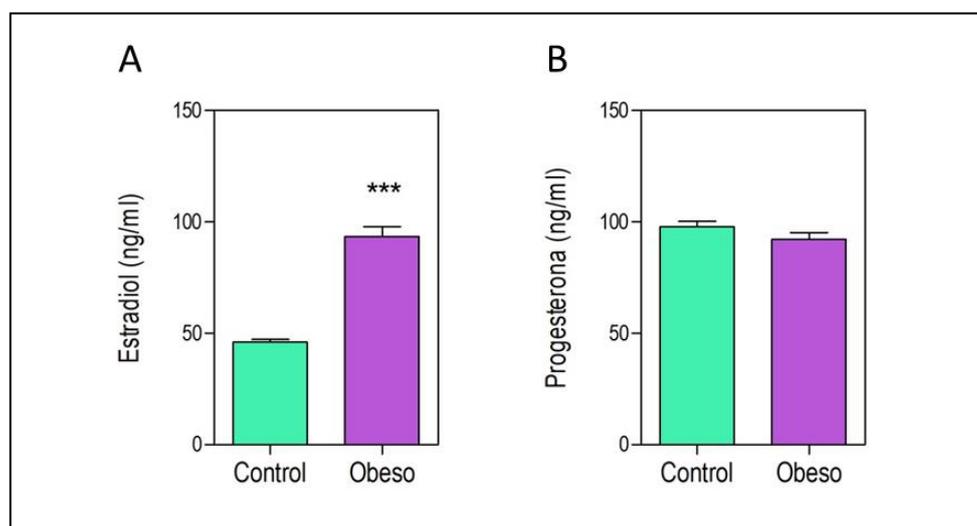


Figura 18: (A) Concentración sérica de Estradiol (ng/ml) y (B) Progesterona (ng/ml) en ratas gestantes de los grupos control (barras verdes) y obeso (barras violetas) en 18.5 gd. Los datos se expresan como la media \pm S.E.M. n= 5/Grupo. ***p<0.001 respecto al grupo control.

4 *La obesidad materna pre-concepcional genera macrosomía fetal*

La evaluación de las unidades fetoplacentarias (UFP) recolectadas en 18.5 gd (Figura 19A) reveló que si bien el peso placentario fue similar en aquellas provenientes de gestantes control y obesas (Figura 19B). Sin embargo, el peso corporal de los fetos fue mayor en aquellos provenientes de las gestantes obesas en comparación a las control (Figura 19C; p<0,05). Estos resultados demuestran que la obesidad no solo afecta la salud individual sino también la de la descendencia.

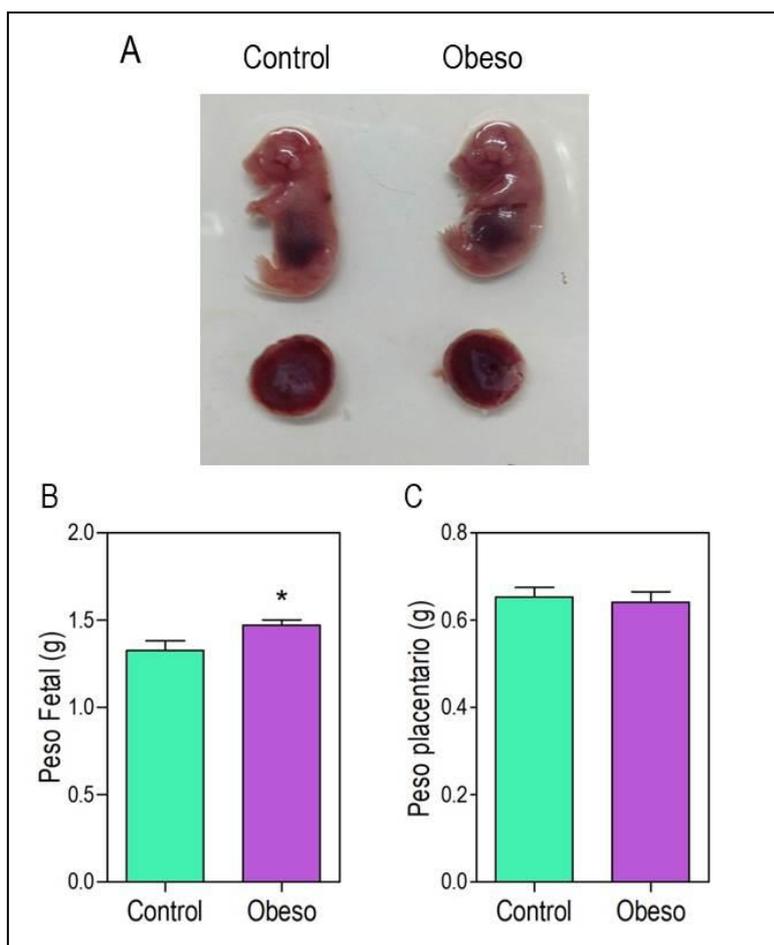


Figura 19: (A) Imagen representativa de fetos de 18.5gd con sus respectivas placentas, (B) Pesos fetales y (C) Pesos placentarios, provenientes de gestantes control y obesas en 18.5 gd. Los valores se expresan como la media \pm S.E.M; n=5/Grupo; *p<0.05 respecto al control.

5 La obesidad materna pre-concepcional genera una disparidad en el número de fetos presentes en ambos cuernos uterinos

El análisis de las UFP en 18.5 gd, reveló, además, que el patrón de distribución de las mismas a lo largo de los cuernos uterinos se veía alterada en ratas obesas.

En gestantes control, las UFP se distribuyeron de manera uniforme a lo largo del cuerno uterino (Figura 20), presentando un número similar de UFP en ambos cuernos uterinos. Sin embargo, esto no ocurrió en las madres obesas; las gestantes obesas presentaron UFP distribuidas de manera dispar (Figura 20): la cantidad de UFP fue diferente entre ambos cuernos uterinos. En base a estos hallazgos, y para lo sucesivo, se denominó cuerno uterino n° 1 (C1) a aquel que presentó el mayor número de UFP y cuerno uterino n° 2 (C2) al que presentó menor cantidad de UFP.

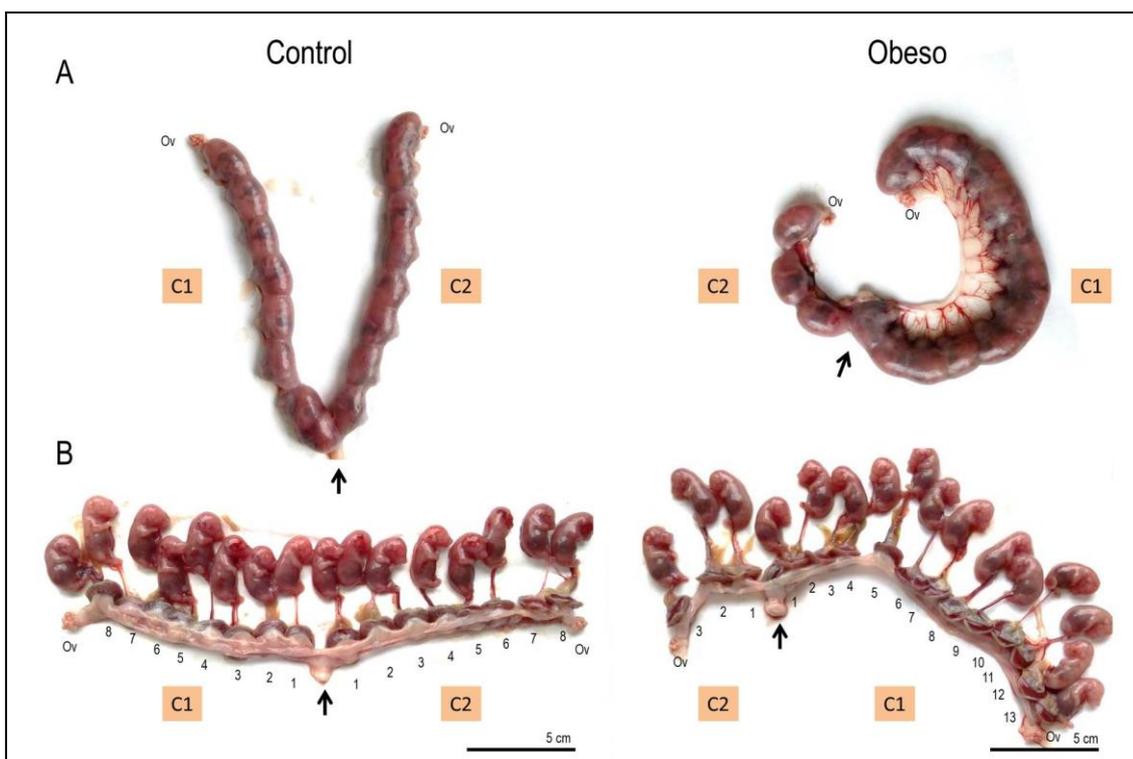


Figura 20: (A) Imagen representativa de las unidades feto-placentarias (UFP) en el útero materno de ratas control y obesas. (B) Exposición de las UFP en cada cuerno uterino. Las flechas indican el cérvix uterino y se enumeran las UFP presentes en cada cuerno uterino. El cuerno uterino con mayor número de fetos fue denominado C1, mientras que el otro cuerno uterino se denominó C2.

A fines de establecer la frecuencia en la que se observaba dicho patrón de distribución de UFP desigual, en primera instancia se estableció una línea de corte que permitiera definir cuando estábamos en presencia del fenómeno de disparidad en el número de UFP entre cuernos uterinos. La diferencia media en el número de UFP observada entre ambos cuernos uterinos en los animales control fue de 3, es por ello que se consideró distribución fetal desigual cuando los animales presentaran una diferencia mayor a 3 UFP entre ambos cuernos uterinos.

Utilizando dicho criterio se observó que el 10 % de los animales control presentaron distribución fetal desigual, mientras que aproximadamente el 85% de las madres obesas lo hicieron ($p < 0,001$; tabla 4).

Al calcular la relación entre el número de UFP presentes en cada cuerno uterino (C2/C1) para cada animal, se observó ésta relación fue de aproximadamente 1 en animales control; mientras que resultó menor a 0.5 en las ratas obesas, producto de la disparidad en el número de UFP presentes entre ambos cuernos uterinos (tabla 4). Estos resultados demuestran que la obesidad materna pre-gestacional altera la manera en que las UFP se distribuyen en los cuernos uterinos.

A pesar de dicha disparidad, el número total de UFP (sumatoria de UFP presentes en ambos cuernos uterinos) fue similar entre gestantes control y obesas (tabla 4).

| Parámetro | Control | Obeso |
|---|---------------|--------------------------------|
| Nº. total de UFP/rata | 17.71 ± 1.30 | 17.57 ± 0.72 |
| Nº de ratas que presentaron distribución fetal dispar (%) | (1/10) 10% | (6/7) 85.71% ^{***} |
| Nº de UFP presentes en C2/C1/ rata. | 0.84 ± 0.06 | 0.44 ± 0.09 ^{**} |

Tabla 4: Efecto de la obesidad sobre la distribución intrauterina de las unidades feto placentarias (UFP) en ratas control y obesas en 18.5 gd. Se consideró distribución fetal dispar cuándo la diferencia de UFP entre cuernos uterinos era mayor a 3. El cuerno uterino con mayor número de fetos fue denominado C1, mientras que el otro cuerno uterino se denominó C2. Los valores se expresan como la media ± SEM o como porcentajes; n=10/Control y n=7/Obeso. ^{**}p<0,01, ^{***}p<0,001 respecto al grupo control.

Al analizar los resultados obtenidos para todos los animales conjuntamente (Figura 21), se observó que el cuerno uterino C1 contenía mayor número de UFP en el grupo obeso que en gestantes control (p<0.05). Por su parte, el cuerno contralateral (C2) contenía menor cantidad de UFP en gestantes obesas que en control (p <0.001).

Estos resultados sugieren que en las gestantes obesas, frente al déficit implantatorio en uno de los cuernos uterinos (C2), se genera un mecanismo compensatorio en el que el cuerno uterino contralateral (C1) implanta un mayor número de embriones, y es por ello que el número total de UFP resulta similar entre animales control y obesas.

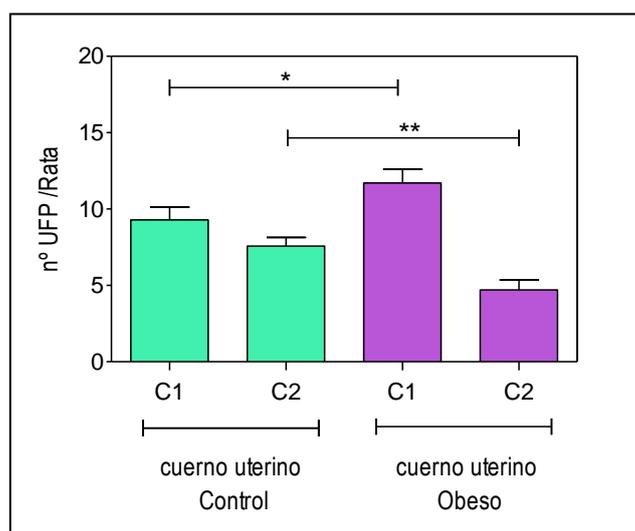


Figura 21: Número de unidades feto-placentarias (UFP) presentes en cada cuerno uterino en rata pertenecientes a los grupo control (barras verdes) y obeso (barras violetas) el 18.5 gd. El cuerno uterino que presentó el mayor número de embriones se denominó cuerno 1 (C1), mientras que al otro cuerno se lo denominó C2. Los datos se expresan como la media ± S.E.M.; n=9/Control y n=6/Obeso; *p <0.05, ^{**}p <0.01 entre los cuernos uterinos indicados del grupo respecto del control.

Este patrón de distribución alterado podría ser consecuencia de pérdidas post implantacionales y/o de una ovulación diferencial entre los ovarios de cada animal. Es por ello que ambos fenómenos fueron evaluados:

5.1 La disparidad en el número de fetos observada en gestantes obesas no es consecuencia de pérdidas post-implantatorias

Al clasificar las UFP en función de su viabilidad, se observó que tanto el número de UFP viables como reabsorbidas no variaron entre hembras del grupo control y obeso. Al calcular, entonces, las tasas de pérdidas post-implantatorias se observó que éstas eran similares entre animales control y obesas (tabla 5). Además, se verificó que las reabsorciones embrionarias se distribuyeron uniformemente entre los cuernos uterinos tanto en el grupo control como obeso. De esta forma, se pudo descartar que la distribución alterada de las UFP detectada en los animales obesos se debiera a reabsorciones embrionarias tardías.

| Parámetro | Control | Obeso |
|------------------------------------|----------------|--------------|
| N°. de UFP viables/rata | 16.86 ± 1.26 | 16.43 ± 0.53 |
| N°. de UFP reabsorbidas/rata | 0.86 ± 0.34 | 1.143 ± 0.40 |
| Pérdidas Post-implantacionales (%) | 4.79 | 6.48 |

Tabla 5: Efecto de la obesidad sobre el desempeño reproductivo de ratas hembras a día 18.5 gd. UFP: unidad feto placentaria. El porcentaje de pérdida post-implantacionales se calculó como la diferencia entre el número de UFP y el número de UFP viables sobre el total de UFP. Los valores se expresan como la media ± S.E.M o como porcentajes; n=10/Control y n=7/Obeso.

5.2 La disparidad en el número de fetos detectada en ratas obesas no se debe a que ocurra ovulación diferencial entre ambos ovarios

A fines de evaluar si la disparidad en el número de UFP presentes entre los cuernos uterinos observada en los animales obesos podría deberse a que éstos presentaran una ovulación diferencial entre ambos ovarios, se cuantificó el número de cuerpos lúteos (CL) presentes en cada ovario.

Se consideró ovario 1 (Ov1) al ovario ipsilateral al cuerno uterino C1 (el que presentó mayor número de UFP), y se denominó ovario 2 (OV2) al contralateral.

El número de CL presentes en cada ovario fue similar en ambos ovarios en todos los animales, por lo cual la relación en el número de CL presentes en Ov2/Ov1 resultó aproximadamente de 1 para cada animal, y fue similar en animales control y obesos (Figura 22 A). Este resultado demuestra que la distribución fetal dispar entre cuernos uterinos detectados en ratas obesas no es consecuencia de una ovulación diferencial entre los ovarios de estos animales.

Como se observa en la figura 22 A, tanto el grupo control y obeso presentó un número similar de CL totales (Ov1+Ov2) (Figura 22 B), demostrando que la tasa ovulatoria no se había visto afectada por la obesidad.

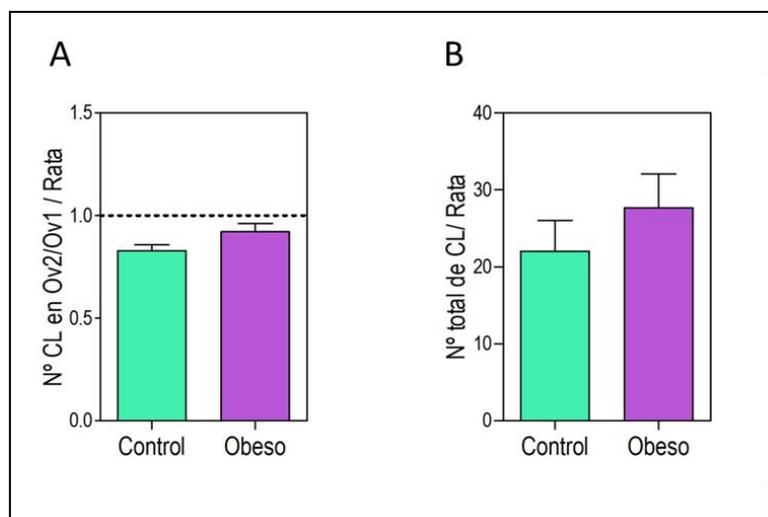


Figura 22: (A) Relación entre el número de cuerpos lúteos (CL) presentes en un ovario respecto del contralateral para cada animal del grupo control (barras verdes) y obeso (barras violetas) en día 18 .5 gd. Se denominó ovario 1 (Ov1) al ipsilateral al cuerno uterino que presentó el mayor número de fetos, mientras que al otro ovario se lo denominó Ov2. (B) Número total de CL (Ov1+Ov2) que presentó cada animal. Los datos se expresan como la media \pm S.E.M.; n= Los datos se expresan como la media \pm S.E.M.; n=4/Grupo.

Los resultados hasta aquí expuestos demuestran que la obesidad materna pre-concepcional genera una disparidad en el número de UFP presentes en ambos cuernos uterinos y que dicha disparidad no es consecuencia de pérdidas post-implantacionales tardías ni de alteraciones en el proceso ovulatorio.

Por todo lo expuesto y a fines de identificar cuándo se produce dicha anomalía y cuáles son sus causas, se analizó la distribución embrionaria en etapas más tempranas de la gestación.

6 La obesidad materna pre-concepcional genera una disparidad en el número de embriones presentes en ambos cuernos uterinos antes de que se produzca la implantación

Nuestro siguiente objetivo fue evaluar si la obesidad adquirida antes de la concepción afecta el posicionamiento embrionario intrauterino inmediatamente luego de que ocurra la implantación embrionaria. Para llevar a cabo este objetivo se monitoreó la gestación hasta el día 5.5 gd, momento en el cual se analizó la distribución intrauterina de los sitios de implantación (SI) (Figura 23).

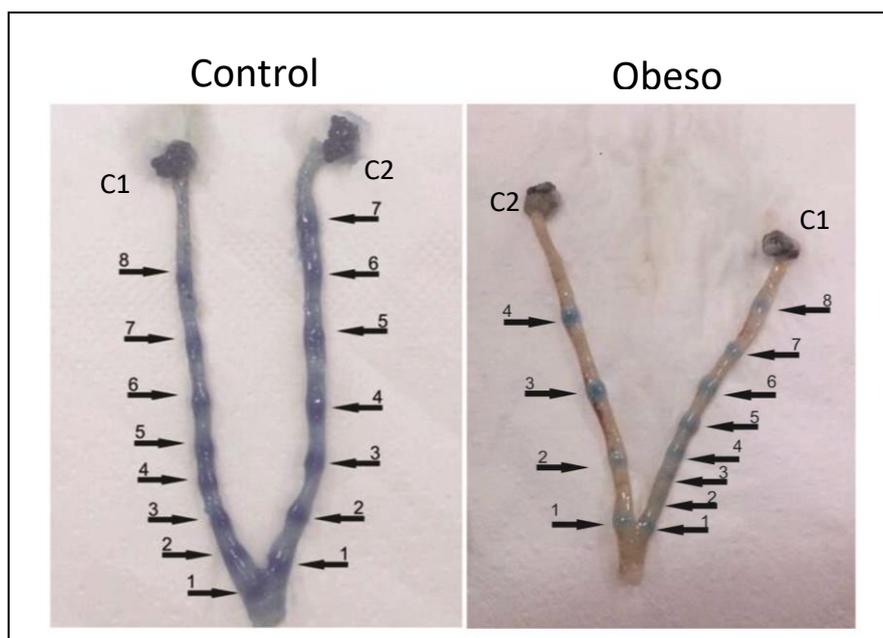


Figura 23: Imágenes representativas del útero de ratas control (Ctrl) y obesas a 5.5 gd luego de la inyección sistémica intravenosa de azul de Chicago (0.1µg/ml) que permite observar los sitios de implantación (SI) como puntos azules. Obsérvese la distribución uniforme de los SI en ratas control y la distribución aberrante de los SI en las gestantes obesas.

La cuantificación de los SI reveló que el número total de SI por rata fue similar entre el grupo control y obeso (Tabla 6).

Las ratas del grupo control presentaron una distribución uniforme de los SI a lo largo de la cavidad uterina (figura 23), presentando todos ellos una diferencia de 3 SI entre ambos cuernos uterinos como máximo, consistentemente con lo observado en 18.5 gd. Es por ello que al calcular la relación entre el número de SI en cada cuerno uterino, el grupo control presentó un valor cercano a 1 (Tabla 6). Por el contrario, el grupo obeso presentó alteraciones en la distribución intrauterina de los SI (figura 23). Todas las gestantes obesas presentaron un espaciamiento dispar de los SI ya que presentaron una diferencia mayor a 3 SI entre ambos cuernos uterinos. Esto fue evidente al calcular la relación entre el número de SI en cada cuerno uterino, ya que dicha relación resultó significativamente menor en este grupo que la del grupo control (0.526 ± 0.049 vs 0.849 ± 0.0348 , respectivamente, $p < 0,001$, tabla 6).

| Parámetro | Control | Obeso |
|---|------------------|---------------------|
| Nº. SI totales en 5.5 gd/rata | 16.29 ± 0.92 | 14.60 ± 0.81 |
| Nº de ratas que presentaron distribución embrionaria dispar (%) | 0 (0/7) | 100 (5/5) |
| Nº de SI presentes en C2/C1/rata | 0.85 ± 0.04 | 0.53 ± 0.05 *** |

Tabla 6: Efecto de la obesidad sobre la distribución intrauterina embrionaria en 5.5 gd. Se consideró distribución embrionaria dispar cuándo el número de Sitios de implantación (SI) presentes en ambos cuernos uterinos difería en más de 3. El cuerno uterino con mayor número de fetos fue denominado C1,

mientras que el otro cuerno uterino se denominó C2. Los valores se expresan como la media \pm S.E.M o como porcentajes; n=7/control, n=5/obeso; ***p<0,001 respecto al grupo control.

A modo de control, como se describió previamente, se contabilizaron los CL presentes en ambos ovarios de cada animal y se calculó la relación entre ambos. Se corroboró que tanto las ratas control como las obesas presentaron un número similar de CL en ambos ovarios (Figura 24A) y que el número total de CL fue similar en ambos grupos (Figura 24B).

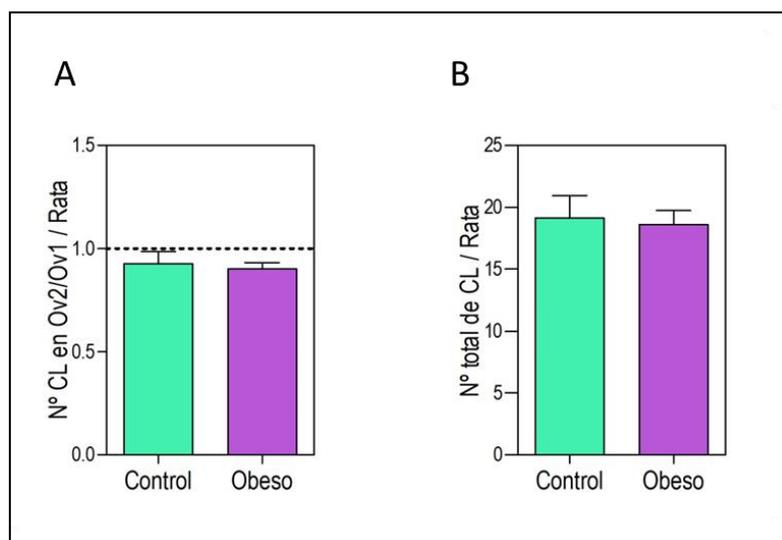


Figura 24: (A) Relación entre el número de cuerpos lúteos (CL) presentes en un ovario respecto del contralateral para cada animal del grupo control (barras verdes) y obeso (barras violetas) en día 5.5 gd. Se denominó ovario 1 (Ov1) al ipsilateral al cuerno uterino que presentó el mayor número de sitios de implantación, mientras que al otro ovario se lo denominó Ov2. (B) Número total de CL (Ov1+Ov2) que presentó cada animal. Los datos se expresan como la media \pm S.E.M.; n=5/Grupo.

Estos resultados son consistentes a lo observado a 18.5 gd, demostrándose, nuevamente, que la distribución embrionaria aberrante detectada en las ratas obesas no es consecuencia de ovulación diferencial entre sus ovarios. Confirmándose, además, que la tasa ovulatoria no se ve alterada como consecuencia de la obesidad.

Cabe aclarar que en 5.5 gd no es posible la observación de reabsorciones embrionarias dado que es un estadio gestacional temprano, inmediatamente posterior a la implantación. Sin embargo, el hecho de observar el patrón de distribución dispar en este estadio gestacional, permite descartar que dicho fenómeno sea consecuencia de reabsorciones embrionarias que ocurran en estadios posteriores.

Por todo lo expuesto se puede concluir que la obesidad impacta sobre la manera en que los embriones se posicionan en la cavidad uterina antes de implantarse.

7 El espaciamiento embrionario intrauterino se ve alterado como consecuencia de la obesidad materna pre-concepcional

El fenómeno por el cual los embriones ingresan al útero materno y se distribuyen uniformemente a lo largo su eje longitudinal se conoce como "separación o espaciamiento embrionario" (Perry y Rowlands 1962; Chen *et al.* 2013; Peavey *et al.* 2017). A fines de estudiar dicho fenómeno, se midió la distancia entre SI adyacentes (distancia inter-sitio) en gestantes en 5.5 gd. La elección de este estadio se fundamentó en que, si bien la distribución embrionaria aberrante era evidente también en 18.5 gd, el gran volumen que presentan las UFP en ese estadio dificulta establecer con exactitud la distancia entre ellas.

Como se muestra en la figura 25, los animales control mostraron la clásica distribución embrionaria en forma de collar de perlas (Lima 2015), presentando SI equidistantes; mientras que el grupo obeso presentó un espaciamiento embrionario aberrante, con algunos SI muy próximos entre sí y otros muy distantes.

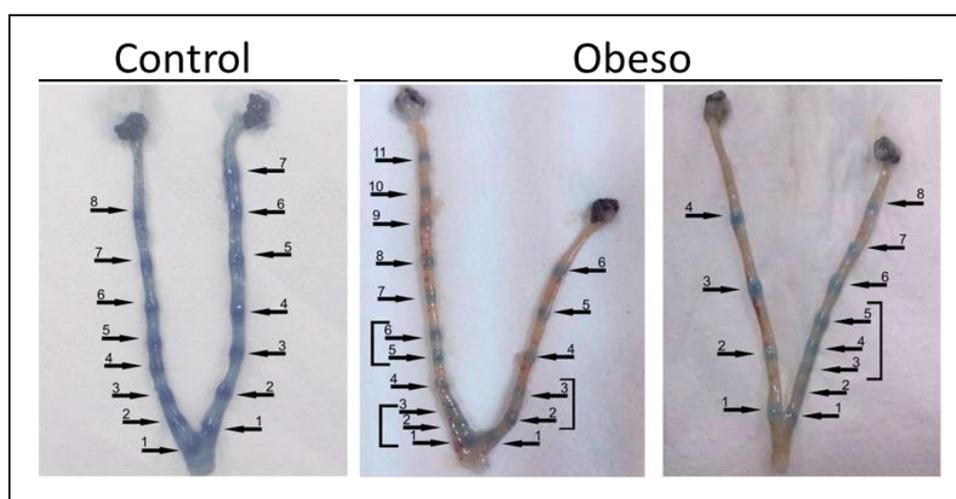


Figura 25: Imágenes representativas del espaciamiento normal (control) y aberrante (obeso) de los sitios de implantación (SI) en ratas gestantes en 5.5 gd. Los SI se observan como puntos azules luego de la inyección sistémica de azul de Chicago a 5.5 gd. Los corchetes indican SI que se encuentran más próximos entre sí que lo que lo hace la media de todos los SI que presenta ese animal, poniendo de manifiesto la irregularidad en el espaciamiento de los SI en el grupo obeso.

Las distancias entre SI adyacentes (intersitio) para cada animal resultan muy cercanas a la distancia promedio intersitio para dicho animal, es por ello que en la Figura 14 puede observarse una pequeña dispersión de cada distancia intersitio respecto del valor medio. Por el contrario, los animales obesos presentaron una gran variabilidad en el espaciamiento de los SI (Figura 26). Esto se evidencia al graficar todas las distancias intersitio evaluadas en cada animal respecto de la distancia intersitio promedio del mismo, donde puede observarse la gran dispersión de los datos respecto del valor medio (Figura 26).

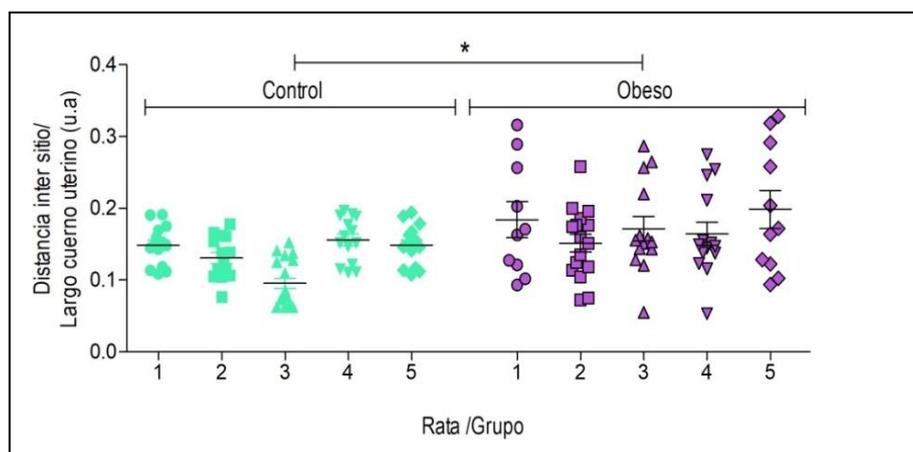


Figura 26: Distancias entre sitios de implantación adyacentes /longitud del cuerno uterino en animales control (verdes) y obesos (violetas) en 5.5 gd. Cada punto representa una distancia inter sitio, la barra representa la media de dichas distancias para cada animal. n=5/Grupo; *p<0,05 respecto al grupo control.

Al analizar la distancias medias los grupos experimentales, se observó una distancia significativamente mayor en el grupo obeso respecto del grupo control ($p<0,005$; Figura 14).

Esta evaluación permite evidenciar cuantitativamente la falta de uniformidad en el espaciamiento de los embriones a los largo del eje longitudinal uterino en el grupo obeso.

En conjunto, los resultados hasta aquí descriptos demuestran que la obesidad modifica la manera en que los embriones se distribuyen en el útero, generando una disparidad en la cantidad de embriones presentes en cada cuerno uterino y alterando el espaciamiento embrionario a lo largo del eje longitudinal del mismo. Dichas alteraciones ocurren en etapas previas al 5.5 gd, es por ello que, a continuación, se evaluaron etapas previas a que ocurra la implantación.

8 La llegada de los embriones al útero materno se ve retrasada como consecuencia de la obesidad materna pre-concepcional.

A fines de estudiar la distribución intrauterina embrionaria en etapas previas a la implantación, se recurrió a la técnica de 'flushing' y se recolectaron los embriones de 4.5 gd.

Como se puede observar en la tabla 7, el número total de embriones presentes en la cavidad uterina fue menor en animales obesos respecto los controles ($p<0.01$). Además, se observó distribución embrionaria dispar entre ambos cuernos uterinos en el 6,25% de los animales del grupo control y en el 87.5% de los animales del grupo obeso ($p<0.001$, tabla 7).

Al calcular la relación entre el número de embriones en cada cuerno uterino, el grupo control presentó un valor cercano a 1, mientras que éste fue de 0.4 aproximadamente para el grupo obeso (0.866 ± 0.037 vs 0.430 ± 0.061 respectivamente, $p<0.01$; Tabla 7);

evidenciándose que en este estadio también existe disparidad en el número de embriones presentes en ambos cuernos uterinos, algo similar a lo descrito para estadios gestacionales más avanzados.

| Parámetro | Control | Obeso |
|---|------------|--------------|
| N° de embriones presentes en cavidad uterina en 4.5 gd/rata | 15.67±0.71 | 12.50±0.76** |
| Frecuencia de animales con distribución embrionaria dispar en 4.5 gd (%). | 6.25 | 87.51*** |
| N° de embriones presentes en C2/C1/rata. | 0.87±0.04 | 0.43±0.06** |

Tabla 7: Efecto de la obesidad sobre la distribución intrauterina embrionaria en ratas control y obesas en 4.5 gd. Se consideró distribución embrionaria dispar cuándo el número de embriones presentes en ambos cuernos uterinos difería en más de 3. El cuerno uterino con mayor número de fetos fue denominado C1, mientras que el otro cuerno uterino se denominó C2. Los valores se expresan como la media ± SEM o como porcentajes; n=16/Control, n=15/Obeso; ** p<0,01 y ***p<0,001 respecto al grupo control (Prueba T de Student y test exacto de Fisher, según corresponda).

Nuevamente, a modo de control, se corroboró que esa distribución embrionaria dispar no fuera consecuencia de alteraciones ovulatorias. Así, se confirmó que el número de cuerpos lúteos fuera similar entre ovarios de un mismo animal tanto en los animales control como obesos; verificándose, además, que las tasas ovulatorias fueron similar en ambos grupos.

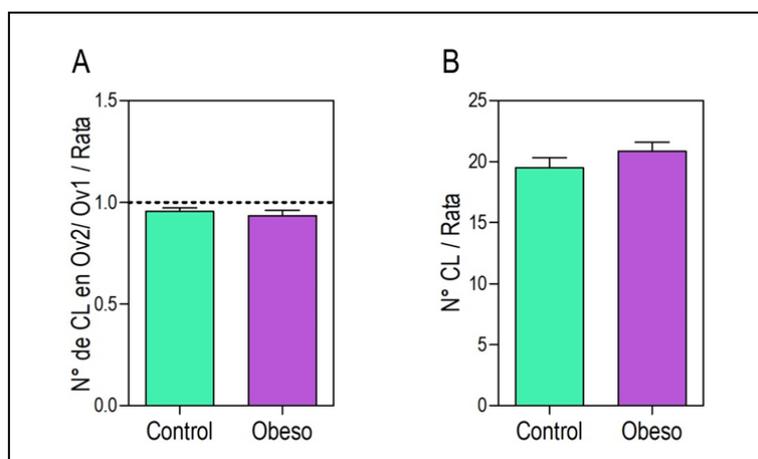


Figura 27: (A) Relación entre el número de cuerpos lúteos (CL) presentes en un ovario respecto del contralateral para cada animal del grupo control (barras verdes) y obeso (barras violetas) en día 4.5 gd. Se denominó ovario 1 (Ov1) al ipsilateral al cuerno uterino que presentó el mayor número de embriones, mientras que al otro ovario se lo denominó Ov2. (B) Número total de CL (Ov1+Ov2) que presentó cada animal. Los datos se expresan como la media ± S.E.M.; n=16/Control, n=15/Obeso.

Estos resultados permiten concluir que la obesidad materna altera la manera en que los embriones se posicionan en el útero materno antes del 4.5 gd.

El hecho de encontrar un menor número de embriones en la cavidad uterina en animales obesos respecto al control en 4.5 gd pero un número similar en 5.5 y 18.5 gd, sugirió que algunos embriones podían encontrarse aún en los oviductos de ratas obesas en 4.5 gd, que serán capaces de ingresar e implantarse más tardíamente. Para verificar esta sugerencia, se realizaron 'flushings' de los oviductos en 4.5 gd y se recolectaron los embriones.

En las ratas del grupo control no se encontraron embriones en los oviductos en 4.5 gd, pero sí en las de gestantes obesas. En éstas, uno de los oviductos presentó mayor número de embriones que el contralateral (Figura 28A; $p < 0.01$). Aquellos oviductos que contenían la mayor cantidad de embriones se ubicaban ipsilateralmente con aquellos cuernos uterinos que presentaban un menor número de embriones.

Al analizar el número total de embriones (realizando la sumatoria entre el número de embriones presentes en los oviductos y en la cavidad uterina), se encontró que éste era similar entre el grupo control y obeso (Figura 28B).

Estos hallazgos demuestran que la obesidad genera un retraso en el pasaje de los embriones del oviducto al útero materno en la rata en 4.5 gd y que dicho efecto es más evidente en un flanco que en otro. El flanco que contiene al cuerno uterino que presenta menor cantidad de embriones se corresponde con el oviducto que contiene más embriones y viceversa.

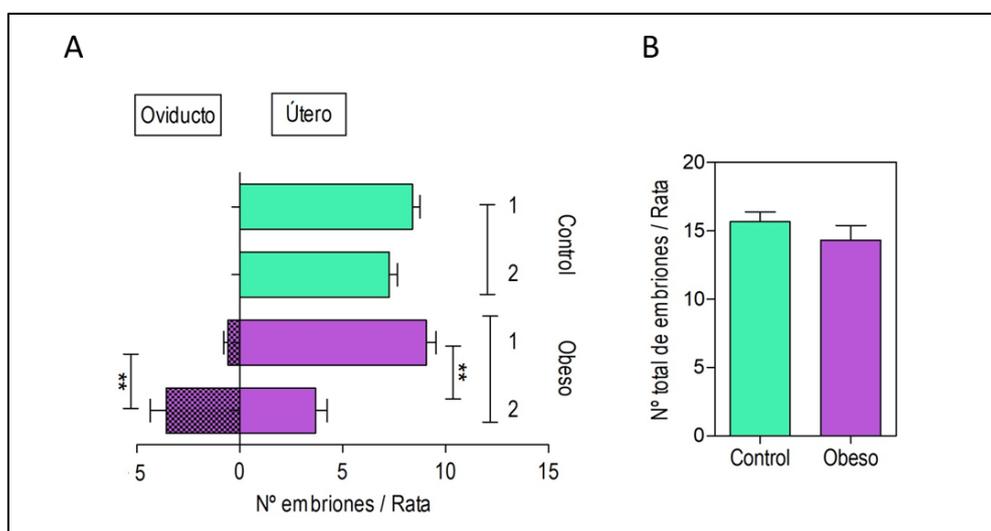


Figura 28: (A) Número de embriones presentes en cada cuerno uterino (barras lisas) y en los oviductos ipsilaterales (barras cuadradas) en animales control (barras verdes) y obesos (barras violetas) en 4.5 gd. El cuerno uterino que presentó el mayor número de embriones se denominó cuerno 1, mientras que al otro se lo denominó 2. (B) Número total de embriones (oviducto + útero) contabilizados en cada animal. Los datos se expresan como la media \pm S.E.M.; $n = 15$ /Control, $n = 17$ / Obeso; $**p < 0.01$ entre los grupos indicados.

9 La disparidad en el número de embriones observada en ratas obesas es consecuencia de un aumento en el número de embriones no viables; observándose además un desfasaje en el desarrollo embrionario.

Con el fin de evaluar si la obesidad afecta la viabilidad y/o el desarrollo embrionario, los embriones colectados en 4.5 gd fueron clasificados, en primera instancia, de acuerdo a su viabilidad. En la figura 29 se muestran imágenes representativas de embriones viables (a, b y c) y no viables (d, e y f) recolectados.

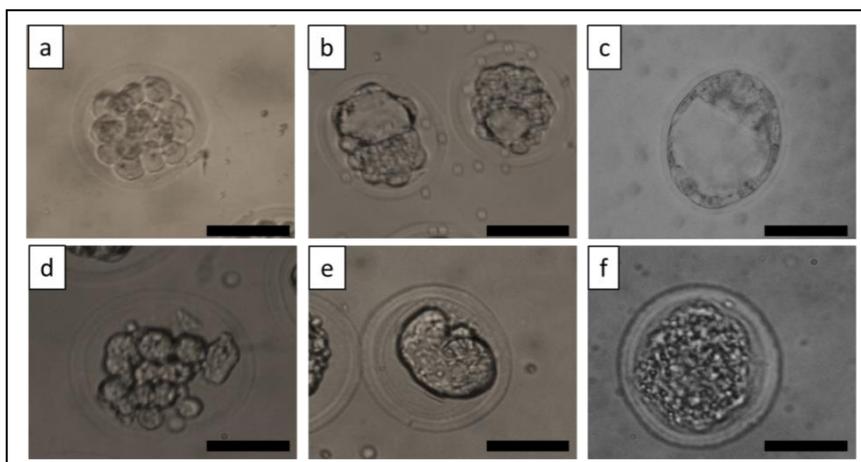


Figura 29: Morfología de embriones obtenidos de ratas control y obesas en 4.5 gd. Micrografías representativas de embriones viables en diferentes estadios (a-c) y de embriones no viables (d-f). a, morula compacta; b, blastocitos iniciales que presentan distintos grado de expansión de la cavidad blastocélica y c, blastocito expandido. d, e y f, embriones no viables (aquellos que presentaron un volumen de lisis mayor al 50%). Barra: 50 μ m.

Como se observa en la figura 30, el grupo obeso presentó un aumento significativo de embriones no viables respecto al grupo control ($p < 0.001$) demostrando que la obesidad materna pre-concepcional afecta negativamente la calidad embrionaria en 4.5 gd (pre-implantatorios).

Con el objeto de analizar si la obesidad materna afecta, además, a la diferenciación embrionaria o 'timing' de embriogénesis, los embriones viables fueron clasificados de acuerdo a su grado de diferenciación (Figura 30).

Las ratas control presentaron la mayoría de los embriones en el estadio de blastocito inicial (67%) y el porcentaje minoritario en el de mórula compacta (4%). Sin embargo, las madres obesas presentaron el mayor porcentaje de embriones en estadios de mórula compacta (49%) y los blastocitos expandidos fueron los minoritarios (6%).

Al realizar las comparaciones entre ambos grupos experimentales, se observó que las ratas obesas presentaron un mayor porcentaje de mórulas compactas ($p < 0.001$) y uno menor

de blastocitos iniciales ($p < 0.001$) y expandidos ($p < 0.001$) que las ratas control, demostrando que existe un desfase en el desarrollo embrionario en gestantes obesas en 4.5 gd.

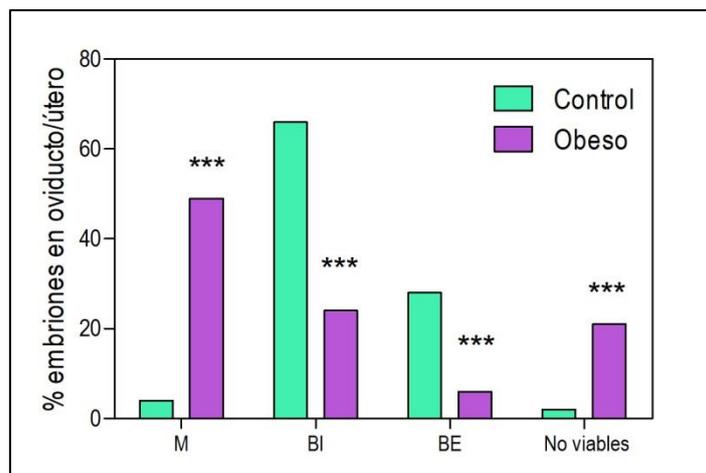


Figura 30: Diferenciación embrionaria in-vivo en 4.5 gd. Los embriones provenientes de ratas controles y obesas fueron recolectados y clasificados según su viabilidad y estadio embrionario: M, mórulas; BI, blastocitos iniciales; BE, blastocitos expandidos. Se consideraron embriones no viables aquellos que presentaron un volumen de lisis mayor al 50%. Los valores se expresan como porcentajes respecto del número total de embriones colectados; $n=5$ ratas/grupo; $**p < 0,01$ y $***p < 0,001$ respecto al control.

Resultó interesante evaluar la distribución de los embriones no viables ya que éstos no podrán implantarse y, consecuentemente, podían ser la causa de la distribución dispar observada en los animales obesos. Para ello, se evaluó el número de embriones no viables presentes en cada cuerno uterino y su correspondiente oviducto.

Como se observa en la figura 31, el grupo control presentó la misma cantidad de embriones no viables en ambos cuernos uterinos. Por el contrario, el grupo obeso presentó un mayor número de embriones no viables en uno de sus flancos (tanto en cuerno uterino como en oviducto) que el otro. El flanco que presentó más embriones no viables resultó ser aquel que presentó menor cantidad de embriones viables en la cavidad uterina (C2).

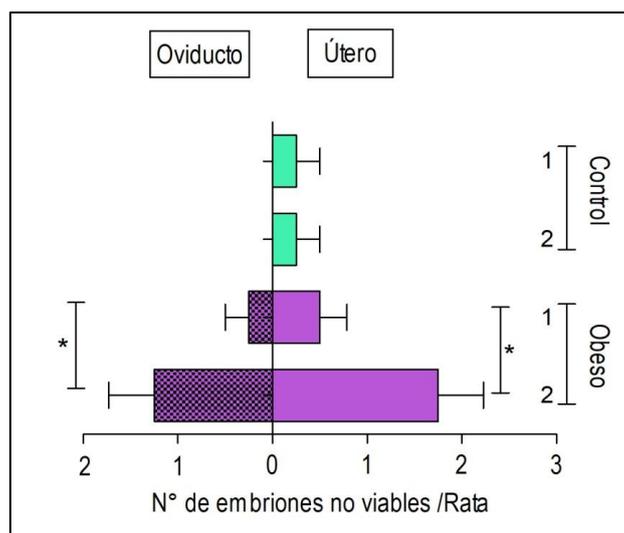


Figura 31: Número de embriones no viables presentes en cada cuerno uterino (barras lisas) y su oviducto ipsilateral (barras cuadrículadas) en animales control (barras verdes) y obesos (barras violteas) en 4.5 gd. El cuerno uterino que presentó el mayor número de embriones viables se denominó cuerno 1, mientras que al otro cuerno se lo denominó 2. Los datos se expresan como la media \pm S.E.M.; n=5/Grupo; *p <0.05 entre los grupos indicados.

Estos resultados sugieren que el aumento en el número de embriones no viables en uno de los flancos (cuerno uterino y oviducto ipsilateral) parece ser uno de los mecanismos por los cuáles la obesidad genera una disminución en la cantidad de sitios de implantación/fetos en uno de los cuernos uterinos como fuere descrito previamente en estadios gestacionales más avanzados. Sin embargo, esto no explicaría la alteración en el espaciamiento intrauterino de los embriones, previamente descrita. Es por ello que el siguiente objetivo fue estudiar las principales moléculas que controlan el posicionamiento embrionario en el útero materno.

10 La expresión uterina del receptor adrenérgico β 2 se ve incrementada durante la pre-implantación como consecuencia de la obesidad materna pre-concepcional.

Diversos son los factores que regulan el posicionamiento embrionario en el útero materno; entre los que se destacan los receptores adrenérgicos (AR) (Chen *et al.* 2013, 2011). La expresión de dichos receptores se encuentra alterada como consecuencia de la obesidad en diversos tejidos; desconociéndose lo que ocurre a nivel uterino.

Además, se desconoce hasta la actualidad cuáles AR se expresan y cuáles no en el útero de la rata. Es por ello que en el presente trabajo se realizó un 'screening' de las diferentes isoformas de los AR en el útero en el día 4.5 gd de ratas control y obesas (Figura 32).

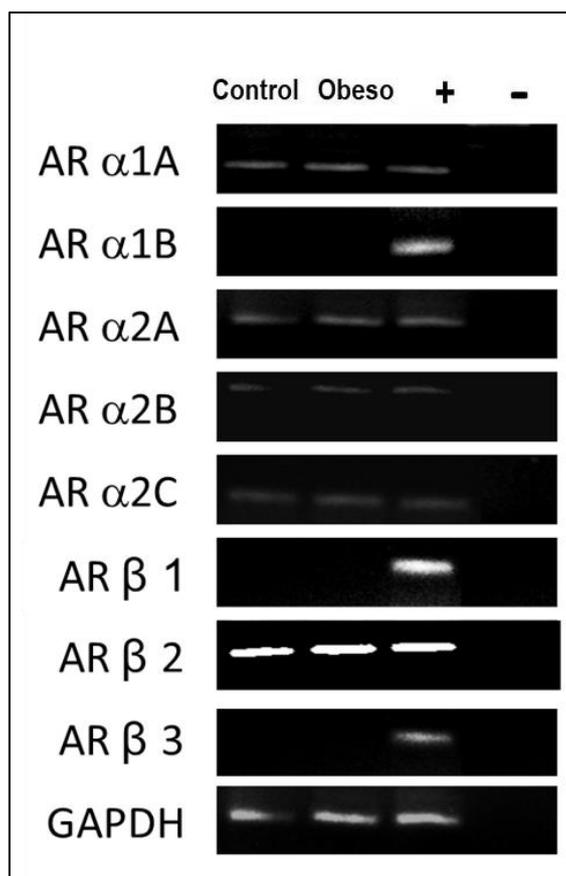


Figura 32: Imagen representativa de la electroforesis en gel de agarosa de se observan los productos de PCR correspondientes a las diferentes isoformas de receptores adrenérgicos (AR) en úteros de ratas control y obesas en 4.5 gd. Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) fue utilizado como control de expresión constitutiva. +: Control positivo; -: Control negativo; n = 5 / Grupo.

Las isoformas detectadas fueron: α 1A AR, α 2A AR, α 2B AR, α 2C AR y β 2 AR; todas ellas presentes tanto en el útero de ratas control como obesas en 4.5 gd. Por el contrario, no se detectó la expresión génica de las isoformas α 1B AR, β 1 AR y β 3 AR ni en úteros control ni en los provenientes de ratas obesas.

Además, como puede observarse, la isoforma β 2 presentó una expresión uterina dominante en 4.5 en ambos grupos de animales. Es por esto último que el próximo objetivo fue evaluar si la obesidad altera la expresión uterina del β 2 AR.

Como se observa en la figura 33, los úteros de ratas obesas en 4.5 gd presentaron una expresión génica de β 2 AR mayor que los úteros de ratas control ($p < 0.05$; Figura 21), indicando que la obesidad induce la expresión uterina del β 2 AR a nivel transcripcional; es por ello que a continuación se evaluó la expresión proteica de dicho receptor.

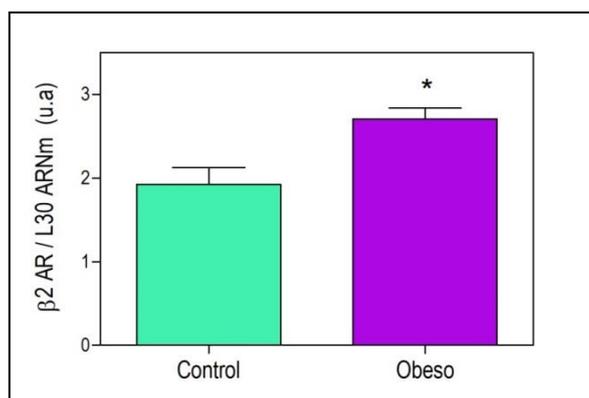


Figura 33: Expresión génica uterina relativa del receptor adrenérgico ($\beta 2$ AR) en ratas control y obesas en 4.5 gd. La proteína ribosomal L30 fue utilizada como control de expresión constitutiva. Los datos se expresan como la media \pm S.E.M.; n=5/Grupo; *p <0.05 respecto al grupo control.

Como puede observarse en la figura 22, la obesidad produjo un aumento en los niveles proteicos de $\beta 2$ AR en los úteros en 4.5 gd al compararlos con los control (p<0.001)

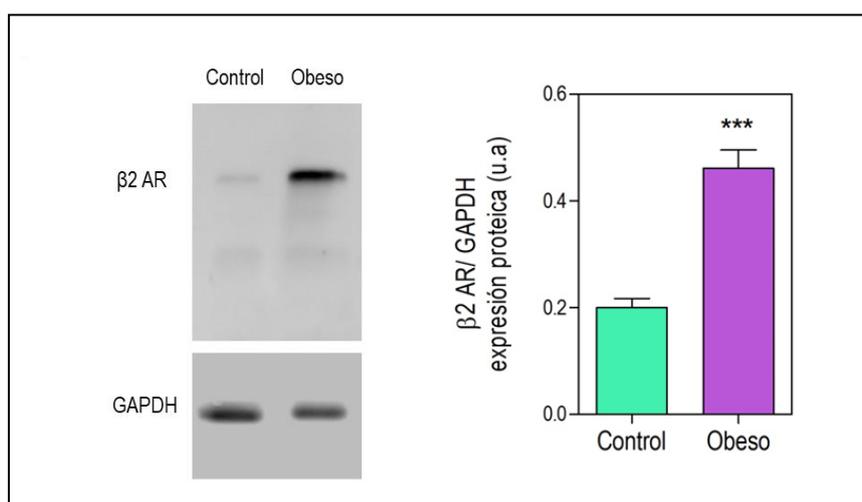


Figura 34: Expresión proteica relativa del receptor adrenérgico $\beta 2$ ($\beta 2$ AR) en úteros de ratas control y obesas en 4.5 gd. Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) fue utilizado como control de carga. **Panel izquierdo:** Imagen representativa del western blot. **Panel derecho:** Análisis densitométrico del western blot. Los datos se expresan como la media \pm S.E.M.; n = 5/Grupo; ***p <0.001 respecto al grupo control.

A partir de estos resultados permiten concluir que la obesidad genera un incremento en los niveles uterinos de $\beta 2$ AR tanto a nivel génico como proteico en 4.5 gd.

Nuestro próximo objetivo fue determinar si la localización de $\beta 2$ AR se ve alterada, o no, en el útero en 4.5 gd como consecuencia de la obesidad. Para ello se llevó a cabo una inmunofluorescencia contra el $\beta 2$ AR en secciones de útero.

Como se observa en la figura 35, $\beta 2$ AR fue detectado mayoritariamente en la musculatura uterina, tanto longitudinal como circular, y en menor medida en el epitelio

luminal y en el estroma. Cuando se comparó su localización entre úteros provenientes de ratas control y obesas, no se detectaron diferencias.

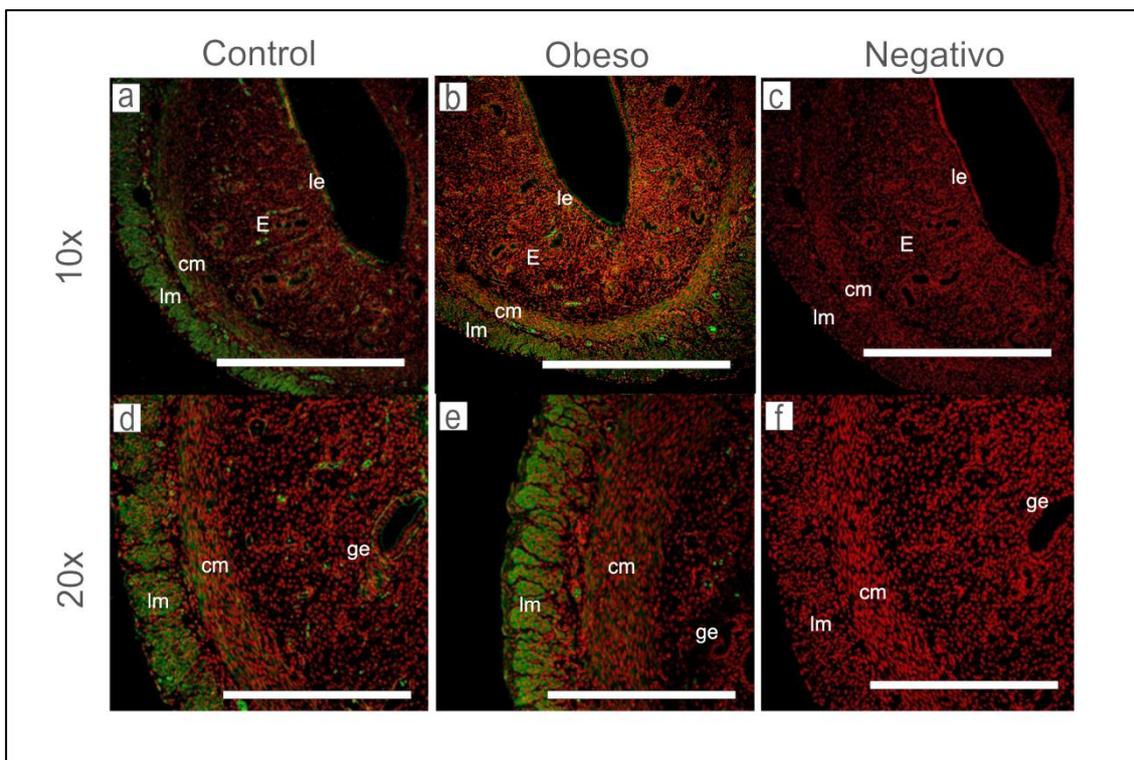


Figura 35: Localización del receptor adrenergico tipo β_2 (β_2 AR) en el útero de ratas control y obesas en 4.5 gd. El color verde corresponde al β_2 AR dado que se utilizó Alexa Fluor 488 como fluoroforo. Los núcleos se visualizan en color rojo dado que fueron marcados con yoduro de propidio. En el control negativo se omitió el uso de anticuerpo primario. E, estroma; Le, epitelio luminal; Ge, epitelio glandular; Lm, capa muscular longitudinal; Cm, capa muscular circular. Barra= 500 μ m; n=5 /Grupo.

En conjunto, estos últimos resultados demuestran que la isoforma β_2 de los AR es la dominante en el útero de rata en 4.5 gd; y que la obesidad estimula su expresión tanto a nivel génico como proteico sin modificar su localización.

11 La obesidad pre-concepcional altera la expresión génica del receptor 3 del ácido lisofosfatidico (LPA3) en úteros preimplantatorios

La activación transitoria del β_2 AR produce una disminución del mRNA LPA3 en el ratón (Chen et al. 2013); mientras que ratones deficientes de *lpa3* presentan un espaciamiento anormal de los sitios de implantación (Ye et al. 2006).

En vistas estas evidencias y al haber detectado un aumento en los niveles de β_2 AR en úteros en 4.5 gd junto con alteraciones en el espaciamiento embrionario en ratas obesas, el próximo objetivo fue evaluar la expresión uterina del LPA3 en ese estadio gestacional.

Cómo se muestra en la figura 36 los animales obesos presentaron una menor expresión uterina de mRNA de LPA₃ respecto al grupo control ($p < 0.05$), demostrando que la obesidad modifica la expresión génica del LPA₃ en útero de la rata en 4.5 gd.

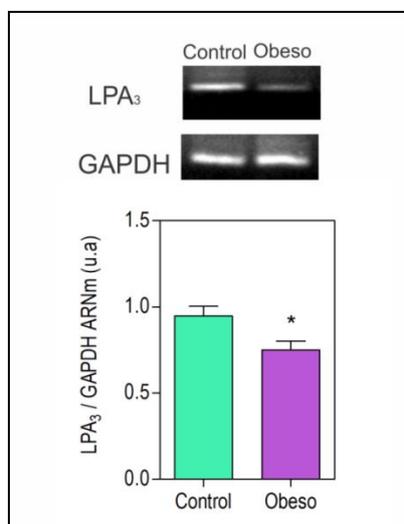


Figura 36: Expresión génica del receptor 3 del ácido lipofosfatídico (LPA₃) en úteros de animales control y obesos en 4.5 gd. **Panel superior:** Imagen representativa de la electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados por PCR. **Panel inferior:** Análisis densitométrico de los productos de PCR. Los datos se expresan como medias \pm S.E.M. en unidades arbitrarias (u.a.). La densidad óptica específica fue normalizada contra Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH); $n=5$ /Grupo; * $p < 0.05$ con respecto al grupo control.

12 La obesidad materna pre-concepcional altera la respuesta y la actividad contráctil del útero preimplantatorio

La peristalsis uterina es un factor clave en la regulación del transporte utero-tubárico embrionario, como así también en el control del posicionamiento embrionario en el lumen uterino (Bulletti y de Ziegler 2006; Chen *et al.* 2013). Es por ello, y por los resultados hasta aquí expuestos, que el próximo objetivo fue evaluar si la obesidad altera la peristalsis uterina en 4.5 gd. Para llevar a cabo este objetivo, se realizó la evaluación de la actividad contráctil miometrial.

En la figura 37 se muestran trazos representativos de los patrones de contracción uterina espontánea evaluada en ratas control y obesas en 4.5 gd, donde pueden observarse como la obesidad modifica el patrón de contracción uterina espontánea.

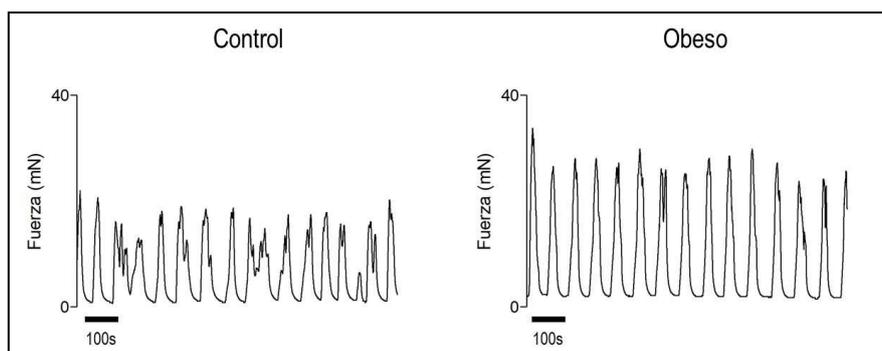


Figura 37: Trazos representativos de patrones de contracción espontáneos evaluados durante 20 minutos en úteros de ratas control y obesas en 4.5 gd.

A partir de esos trazos, se calcularon la amplitud y la frecuencia de las contracciones, así como también la actividad integral (área bajo la curva de fuerza en función del tiempo).

Debido a la disparidad en el número de embriones presentes en ambos cuernos uterinos previamente descrito en las ratas obesas, resultó de interés evaluar si el patrón de contracción era diferente en ambos cuernos uterinos.

En la tabla 8 se exponen los resultados obtenidos para ambos cuernos uterinos (C1 y C2); además, para cada parámetro evaluado se calculó la relación entre ambos cuernos (C2/C1) a fines de facilitar el análisis estadístico.

La frecuencia, amplitud y actividad relativa entre ambos cuernos uterinos fueron de aproximadamente 1 tanto en los animales control y obesos; esto pone de manifiesto que los patrones de contracción fueron similares en ambos cuernos uterinos y que no se vieron modificados como consecuencia de la obesidad. Es por ello, y a fines de simplificar el análisis, que en lo sucesivo se compararon los promedios obtenidos entre ambos cuernos uterinos para cada animal.

| Parámetro | Control | | | Obeso | | |
|---------------------------|------------------|----------------|----------------|------------------|---------------|----------------|
| | Cuernos uterinos | | Relación C2/C1 | Cuernos uterinos | | Relación C2/C1 |
| | C1 | C2 | | C1 | C2 | |
| Frecuencia (1/s) | 0.01±0.01 | 0.01±0.01 | 1.35±0.16 | 0.02±0.01 | 0.02±0.01 | 0.95±0.06 |
| Amplitud (mN) | 14.75±2.49 | 14.69±1.467 | 1.09±0.21 | 26.31±1.46 | 24.58 ± 2.80 | 0.93±0.09 |
| Actividad integral (mN.s) | 2293,02±432.42 | 2030,09±584.32 | 0.9410±0.21 | 3410,09±59.99 | 4169,08±70.87 | 0.90±0.18 |

Tabla 8: Análisis de la actividad contráctil espontánea uterina en ambos cuernos uterinos (C1 y C2) provenientes de ratas control y obesas en 4.5 gd. El cuerno uterino que presentó el mayor número de embriones viables se denominó cuerno 1, mientras que al otro cuerno se lo denominó 2. Los parámetros calculados fueron: frecuencia, amplitud y actividad integral (área bajo las curvas de fuerza en función de tiempo). Los datos se expresan como la media ± S.E.M.; n = 5/Grupo.

En la figura 38 A, se observa que la frecuencia de las contracciones uterinas fue similar entre ratas control y obesas en 4.5 gd. Sin embargo, la amplitud y la actividad integral de las contracciones fueron mayores en los úteros provenientes de ratas obesas comparadas con los controles (Figura 38 B y C; $p < 0.01$ y $p < 0.05$, respectivamente).

Estos resultados demuestran que la obesidad incrementa la actividad contráctil uterina espontánea en ratas en 4.5 gd.

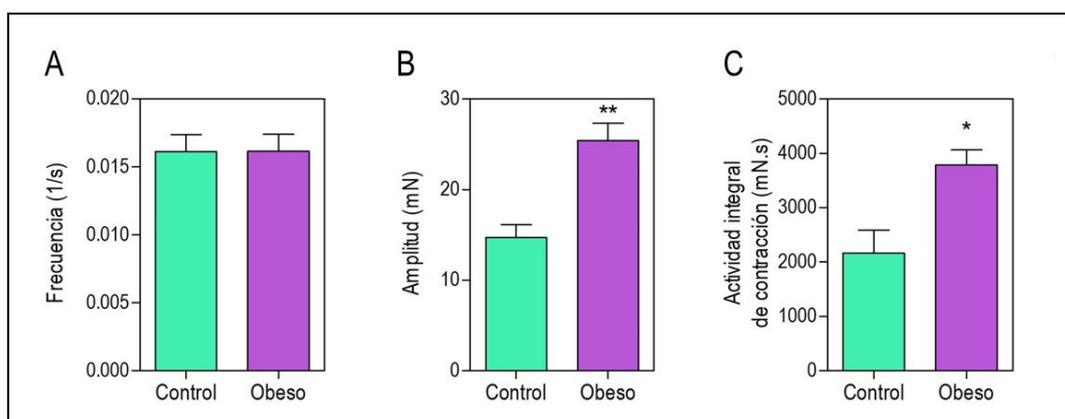


Figura 38: Efecto de la obesidad sobre la actividad contráctil uterina espontánea en ratas de 4.5 gd. El análisis de la actividad contráctil espontánea incluyó: (A) frecuencia, (B) amplitud y (C) Actividad integral (área bajo las curvas de fuerza en función de tiempo). Los datos se expresan como la media \pm S.E.M.; $n = 5$ /Grupo; * $P < 0.05$, ** $p < 0.01$ respecto al control.

El hecho de haber detectado un incremento en la actividad contráctil uterina espontánea en animales obesos a pesar de éstos presentar un aumento en los niveles uterinos de $\beta 2$ AR, receptor cuya activación estimula la relajación uterina, nos llevó a evaluar si la cadena de señalización desencadenada por el $\beta 2$ AR tenía la capacidad, o no, de ser activada en los animales obesos. Para ello, se evaluó la actividad contráctil en respuesta a un agonista selectivo del $\beta 2$ AR (Salbutamol) en el úteros de ratas control y obesas en 4.5 gd.

En la figura 39 se observa el perfil de respuesta de los úteros a concentraciones crecientes, evidenciándose que tanto los úteros provenientes de ratas control como obesas responden al salbutamol, disminuyendo su actividad contráctil.

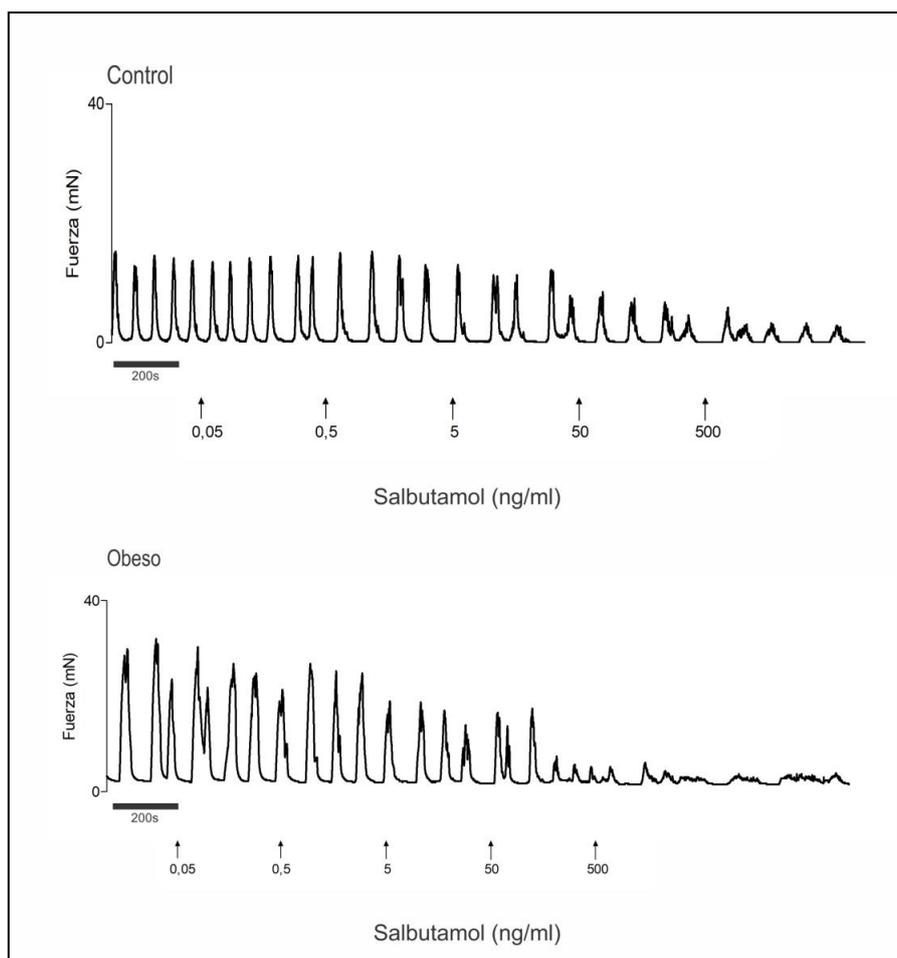


Figura 39: Trazos representativos de patrones de contracción uterina en respuesta a dosis acumulativas de Salbutamol (0.05-500 ng/ml) evaluados en ratas control (**panel superior**) y obesas (**panel inferior**) en 4.5 gd.

A partir de dichos trazos se calculó la amplitud, frecuencia y actividad integral de contracción de las curvas en respuesta a salbutamol, y fueron relativizadas a las evaluadas espontáneamente para realizar las comparaciones entre ambos grupos experimentales (Figura 40).

Al analizar las curvas de ratas control, se encontró que la amplitud de las mismas disminuyó significativamente respecto de la espontánea desde la dosis de 5 ng/ml de salbutamol, manteniéndose así con las dosis de 50 y 500 ng/ml ($p < 0.05$, $p < 0.001$ y $p < 0.001$, respectivamente; Figura 40A). En el grupo obeso, la disminución significativa de la amplitud se observó desde la dosis de 0.5 ng/ml de salbutamol ($p < 0.01$), manteniéndose en las sucesivas: 5, 50, 500 ng/ml ($p < 0.001$; Figura 40A).

Cuando se realizaron comparaciones entre animales control y obesos para cada concentración de salbutamol, se encontró que las amplitudes fueron menores en los úteros proveniente de ratas obesas que en las control para las concentraciones 5 y 50 ng/ml de salbutamol ($p < 0.05$; Figura 40A).

Al evaluar la frecuencia de las contracciones uterinas en respuesta a salbutamol, en el grupo control se detectó una disminución significativa respecto de la frecuencia espontánea al administrar 500 ng/ml de salbutamol ($p < 0.01$; Figura 40B). En el grupo obeso, la frecuencia de las contracciones disminuyó significativamente en las dosis 5, 50 y 500 ng/ml de salbutamol ($p < 0.05$, $p < 0.001$ y $p < 0.001$ respectivamente; Figura 40B).

Cuando se compararon las frecuencias entre los animales control y los obesos para cada concentración de salbutamol, se encontró que los úteros de animales obesos presentaron una frecuencia significativamente menor que los controles para la concentración 50 ng/ml ($p < 0.05$).

Por otro lado, en el grupo control se detectó una disminución de la actividad contráctil integral respecto de la espontánea a partir de la dosis de salbutamol de 0,5 ng/ml ($p < 0,01$) y en las dosis subsiguientes (5 a 500 ng/ml; $p < 0,001$) (Figura 40C). Por su lado, en el grupo obeso se detectó una disminución significativa del área bajo la curva de contracción (Figura 40C) respecto de la espontánea para todas las concentraciones de salbutamol evaluadas (0,05 a 500 ng/ml; $p < 0,001$).

Cuando se compararon dichas áreas entre los animales control y los obesos para cada concentración de salbutamol, éstas resultaron menores en el grupo obeso en comparación con los controles para la dosis de 0.5, y 5 ng/ml ($p < 0.05$ y $p < 0.001$, respectivamente).

Todos estos resultados demuestran que la obesidad genera una mayor sensibilidad a salbutamol por parte de los úteros en 4.5 gd.

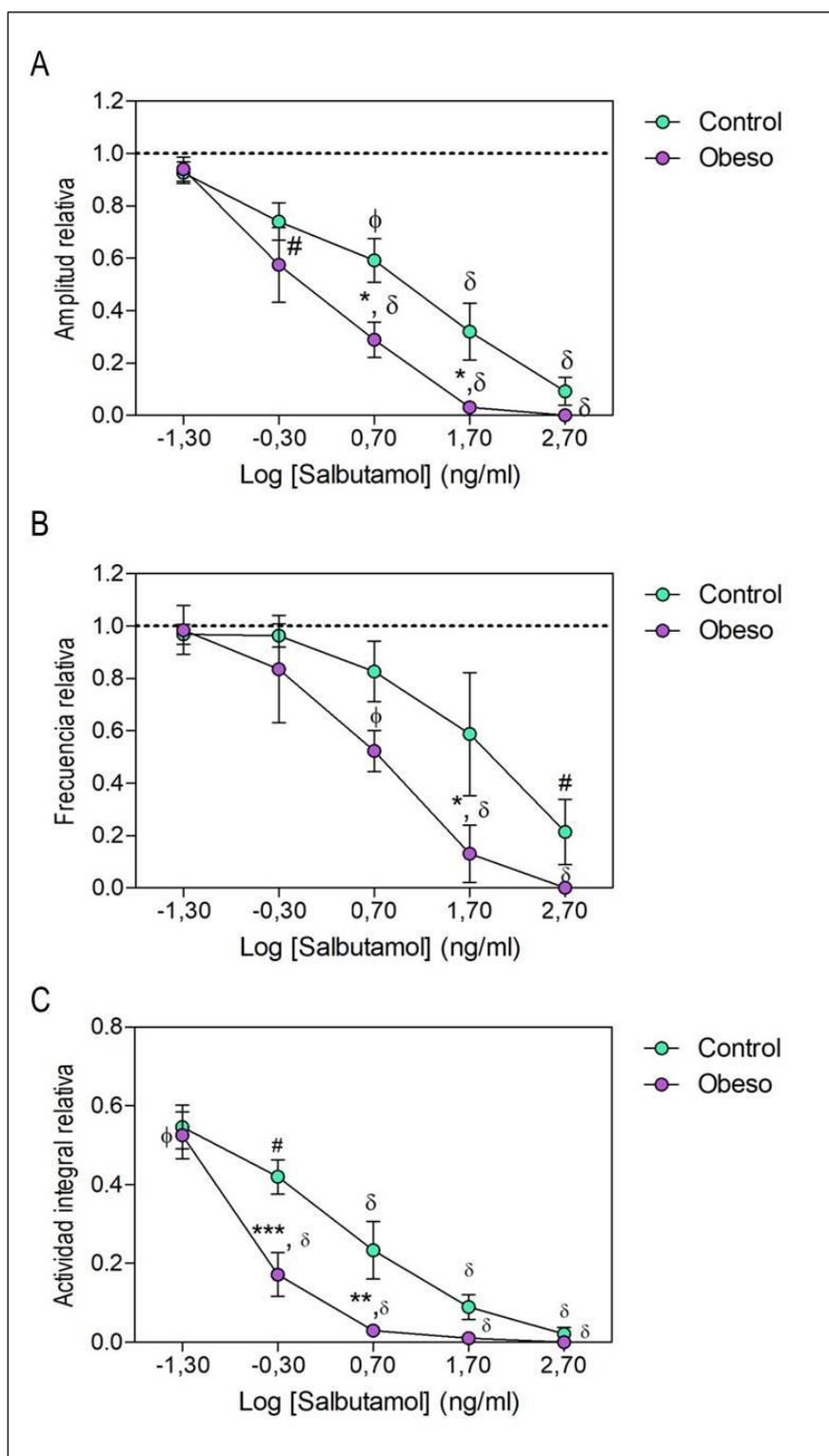


Figura 40: Efecto de la obesidad sobre la actividad contráctil uterina en respuesta a salbutamol en ratas de 4.5 gd. El análisis incluyó: (A) frecuencia, (B) amplitud y (C) actividad integral (área bajo las curvas de fuerza en función de tiempo) de la contracción en función del logaritmo de la concentración de salbutamol (0.05-500 ng/ml). Cada concentración fue evaluada durante 7 minutos y normalizados a la amplitud espontánea. Los datos se expresan como la media \pm S.E.M.; n=5/Grupo; *p<0.05 y ***p<0.001 indican diferencias significativas entre grupos control y obeso para la misma concentración de agonista, mientras que ϕ p<0.05, # p<0.01 y δ p<0.001 indican diferencias significativas en comparación con la actividad espontánea del grupo.

13 La expresión uterina del receptor nuclear activado por proliferadores peroxisomales gamma (PPARY) se ve disminuida durante, la pre-implantación, como consecuencia de la obesidad pre-concepcional.

Debido al aumento de la actividad contráctil uterina espontánea detectada en ratas obesas en 4.5 gd y conociendo el rol fundamental que ejerce el receptor nuclear activado por proliferadores peroxisomales de tipo gamma (PPARY) en el mantenimiento de la quiescencia uterina (Dunn-albanese *et al.* 2004), el próximo objetivo propuesto fue evaluar la expresión uterina de PPARY en animales control y obesos en 4.5 gd.

Cómo se observa en la figura 41, PPARY se expresa en el útero tanto de ratas control y obesas en 4.5 gd. La expresión proteica de dicho factor de transcripción resultó ser más baja en úteros de animales obesos que en controles ($p < 0.05$; Figura 41).

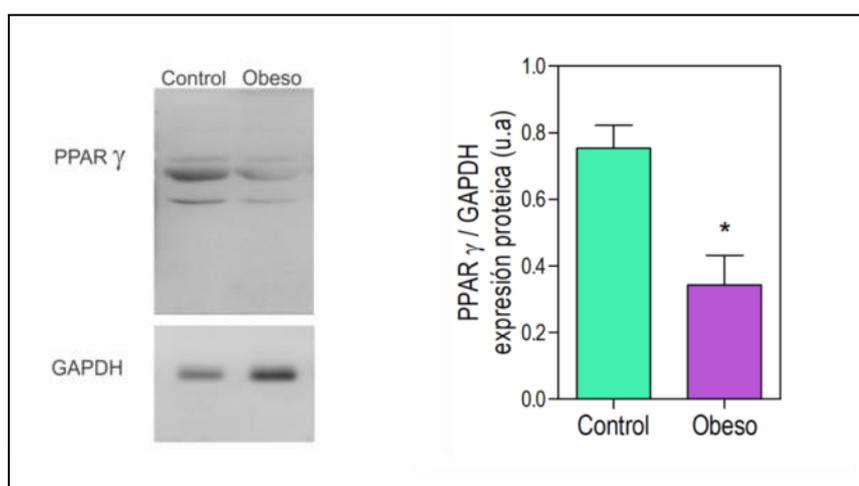


Figura 41: Expresión proteica relativa del receptor nuclear activado por proliferadores peroxisomales gamma (PPARY) en útero de ratas control y obeso en 4.5 gd. Glicer aldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) fue utilizado como control de carga. **Panel izquierdo:** Imagen representativa del western blot. **Panel derecho:** Análisis densitométrico del western blot. Los datos se expresan como la media \pm S.E.M.; $n = 5$ / Grupo; * $p < 0.05$ respecto al grupo control

Conclusiones parciales II

Los resultados hasta aquí expuestos permiten concluir que la obesidad materna pre-concepcional altera el desempeño reproductivo en ratas hembras, generando sub-fertilidad y demora la concepción.

En este capítulo se describe, además, que la obesidad materna pre-concepcional retrasa la llegada de los embriones al útero materno, alterando la manera en que los embriones se posicionan en el útero antes de que ocurra la implantación. Por un lado, genera una disparidad en el número de embriones presentes entre ambos cuernos uterinos y, por otro lado, altera el espaciamiento embrionario intrauterino. Los resultados obtenidos sugieren que la disparidad en el número de embriones presentes en ambos cuernos uterinos es consecuencia de la disminución de la calidad embrionaria que la obesidad genera en uno de los cuernos uterinos.

Al evaluar las posibles causas de las alteraciones en el espaciamiento embrionario intrauterino se encontró que la obesidad generó alteraciones en los principales factores que lo regulan; en úteros de gestantes obesas se detectó una disminución en la expresión de Lpa3 y de PPARY, concomitantemente con un aumento en la expresión uterina de β 2AR, una mayor sensibilidad uterina a salbutamol (agonista selectivo β 2AR) y un aumento de la actividad contráctil uterina espontánea, cuando se las comparó con úteros control. Esto no es un hecho menor, dado que el mantenimiento de la quiescencia uterina resulta un factor clave para garantizar una correcta implantación embrionaria.

Respecto del efecto de la obesidad sobre la descendencia, se observó un desfase en el desarrollo de los embriones en gestantes obesas respecto de las control. Pese a ello, el número total de sitios de implantación (evaluados en 5.5 gd) y de fetos (evaluados en 18.5 gd) fue similar entre las gestantes obesas y las controles, lo que manifiesta que a pesar de dicho desfase, los embriones logran implantarse. Esto nos lleva a sugerir que la obesidad genera un desfase de la ventana de implantación y es por ello que pese a las diferencia de estadio y localización de los embriones respecto al grupo control, estos embriones logran implantarse.

Las alteraciones uterinas producidas por la obesidad materna descritas hasta aquí, sumado a las alteraciones hormonales que las gestantes obesas presentaron al avanzar la gestación (18.5 gd) generaron efectos sobre descendencia, induciendo macrosomía fetal.

Todas estas evidencias demuestran que la obesidad no solo afecta la capacidad reproductiva de la hembra, sino que también afecta la salud de su descendencia.

CAPÍTULO III: ESTUDIO DEL EFECTO DE LA OBESIDAD SOBRE EL AMBIENTE UTERINO PRE-CONCEPCIONAL

El hecho de encontrar que la obesidad materna generó macrosomía fetal nos sugirió que ambiente uterino podía verse alterado por la obesidad. En el capítulo II demostramos que, efectivamente, el ambiente intrauterino se ve afectado como consecuencia de la obesidad materna; generando alteraciones en todos los períodos gestacionales evaluados: pre-implantación, post-implantación temprana y gestación tardía. Estos hallazgos llevaron a preguntarnos si el ambiente intrauterino se vería afectado por la obesidad previamente a que ocurra la concepción. Es por ello que el siguiente objetivo fue evaluar el microambiente uterino en animales en ciclo (pre-gestantes).

1 El ambiente uterino se ve alterado como consecuencia de la obesidad antes de que ocurra la concepción.

El suministro de glucosa y su metabolismo resultan indispensables para que ocurra la diferenciación endometrial hacia un estado receptivo que propicie la implantación embrionaria (Wolff *et al.* 2003; Frolova y Moley 2011a). Las proteínas transportadoras de glucosa (GLUT) son las encargadas de mediar el ingreso de este azúcar desde compartimiento extracelular al intracelular (Holman 2018; Joost y Thorens 2001); GLUT-1 media el suministro basal de la glucosa en diversos tipos celulares, mientras que GLUT-4 lo hace bajo el estímulo de insulina (Holman 2018).

Si bien el útero no ha sido descrito como un órgano blanco clásico de insulina (Zhang *et al.* 2016), existe amplia evidencia que sugiere que la insulina tiene un efecto directo sobre la función endometrial, modificando la expresión génica, la síntesis de proteínas, la división celular y el transporte de glucosa en el útero (Lathi *et al.* 2005; Pustovrh *et al.* 2010).

Por todo lo expuesto y debido a la intolerancia a glucosa y a la resistencia sistémica a insulina con la que cursan las ratas obesas, fue de interés evaluar si la obesidad altera la captación de glucosa por parte del útero y analizar si éste resulta un órgano sensible a insulina.

1.1 La obesidad induce resistencia a insulina a nivel uterino por mecanismos que involucran la disminución en la expresión génica del receptor de insulina.

La incorporación de glucosa fue evaluada *ex vivo* en úteros provenientes de animales control y obesos luego de realizados los 60 días de protocolo dietario. Se cuantificó la incorporación uterina de glucosa en condiciones basales y bajo el estímulo de insulina.

La captación basal de glucosa fue similar en úteros provenientes de ratas control y obesas. Insulina estimuló la captación de glucosa por parte de los úteros control 1.6 veces respecto del basal ($p < 0.05$), mientras insulina no tuvo efecto sobre la captación de glucosa en úteros provenientes de ratas obesas (figura 42).

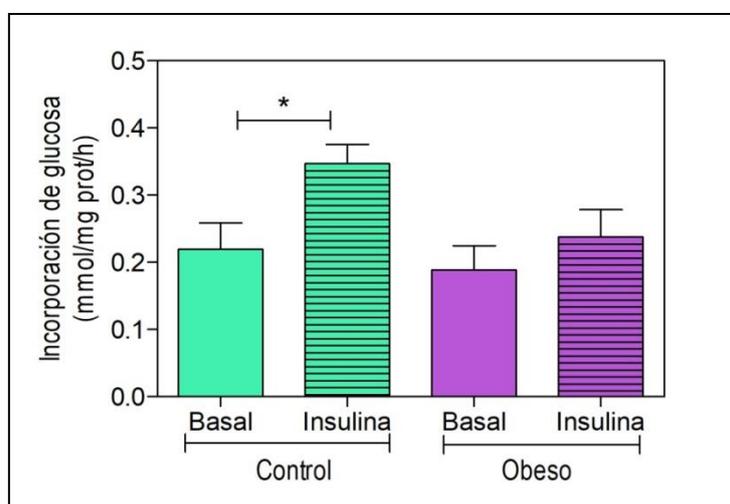


Figura 42: Incorporación uterina de 2D-glucosa en animales control (barras verdes) y obesos (barras violetas) pre-gestantes en condiciones basales (barras lisas) y frente al estímulo de insulina (100ng/mL, barras rayadas). Los datos son representados como la media \pm S.E.M; $n=8$ /Grupo; * $p < 0.05$ respecto de la condición basal.

Estos resultados muestran, por un lado, que el útero de la rata es un órgano sensible a insulina en condiciones normales y, por otro, que la obesidad induce resistencia a insulina a nivel uterino.

Estos hallazgos condujeron a evaluar la expresión uterina del receptor de insulina (InsR) y de los glucotransportadores GLUT-1 y GLUT-4.

Como puede observarse en la figura 43), se detectaron niveles inferiores del ARNm que codifica para el InsR en úteros de animales obesos en comparación con los controles ($p < 0.05$, Figura 43 C). Por su parte, la expresión génica tanto de Glut-1 como de Glut-4 no se vieron modificadas como consecuencia de la obesidad (Fig. 43 A y B).

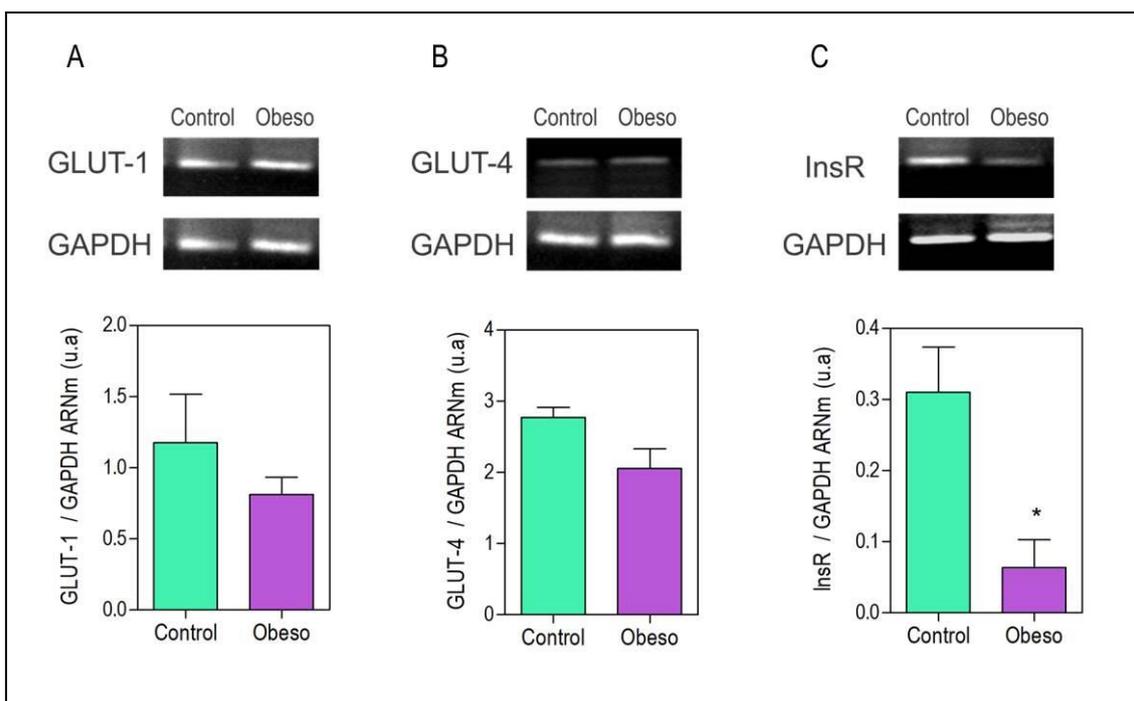


Figura 43: Expresión génica de: (A) Glucotransportador tipo 1 (Glut-1), (B) Glucotransportador tipo 4 (Glut-4), (C) Receptor de insulina (InsR), evaluadas en úteros de animales de control y obesos pre-gestantes. Paneles superiores: Imágenes representativas de la electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados por PCR. Paneles inferiores: Análisis densitométricos de los productos de PCR. Los valores se expresan como medias \pm S.E.M. de la densidad óptica específica normalizada contra Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), en unidades arbitrarias (u.a); n=5/Grupo; * p < 0.05 con respecto al grupo control.

Estos resultados demuestran que la obesidad genera un cambio en la regulación transcripcional del *InsR* a nivel uterino; pudiendo esto contribuir con al desarrollo de resistencia a insulina local en los animales obesos.

1.2 La expresión génica del factor 1 α inducible por hipoxia (Hif 1 α) se ve estimulada a nivel uterino como consecuencia de la obesidad

La sensibilidad a insulina es controlada por numerosos factores, entre los que se destaca el factor 1 α inducible por hipoxia (Hif 1 α). La hipoxia celular es un estado comúnmente asociado a la obesidad que se produce como consecuencia del exceso de tejido adiposo (Srdic *et al.* 2010). En esas condiciones, Hif 1 α se activa, regulando la transcripción de más de 100 genes diana, entre los que se encuentran los transportadores de glucosa y el InsR (Semenza 2011; Görgens *et al.* 2017). Es por ello, que resultó interesante analizar si la expresión uterina de Hif 1 α se modifica como consecuencia de la obesidad.

Como puede observarse en la figura 44, la expresión génica de Hif 1 α fue mayor en úteros de animales obesos que en el grupo control (p < 0,05), sugiriendo que la obesidad

genera un estado de hipoxia celular a nivel uterino que se evidencia por el aumento en la expresión génica de Hif 1 α en este órgano.

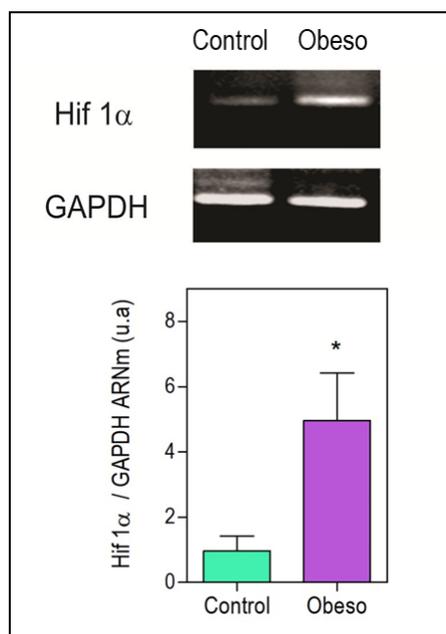


Figura 44: Expresión génica del factor 1 α inducible por hipoxia (Hif 1 α) en úteros de animales control y obesos pre-gestantes. **Panel superior:** Imagen representativa de la electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados por PCR. **Panel inferior:** Análisis densitométricos de los productos de PCR. Los valores se expresan como medias \pm S.E.M. de la densidad óptica específica normalizada contra Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), en unidades arbitrarias (u.a); n=5/Grupo; * p <0.05 con respecto al grupo control.

1.3 La expresión proteica del receptor nuclear activado por proliferadores peroxisomales gamma (PPAR γ) no se ve alterada en el útero como consecuencia de la obesidad.

El receptor nuclear activado por proliferadores peroxisomales gamma (PPAR γ) se destaca por su rol en la regulación del almacenamiento de ácidos grasos, del metabolismo de la glucosa y de la capacidad de respuesta a insulina en diversos tejidos (Armoni *et al.* 2007). Por esta razón, nuestro próximo objetivo fue evaluar la expresión proteica de este factor de transcripción en útero de animales pre-gestantes.

Cómo se observa en la figura 45, tanto los úteros provenientes ratas control como obesas expresan la isoforma γ de PPAR. El análisis densitométrico reveló que la expresión proteica de PPAR γ no se ve alterada como consecuencia de la obesidad a nivel uterino (Figura 45).

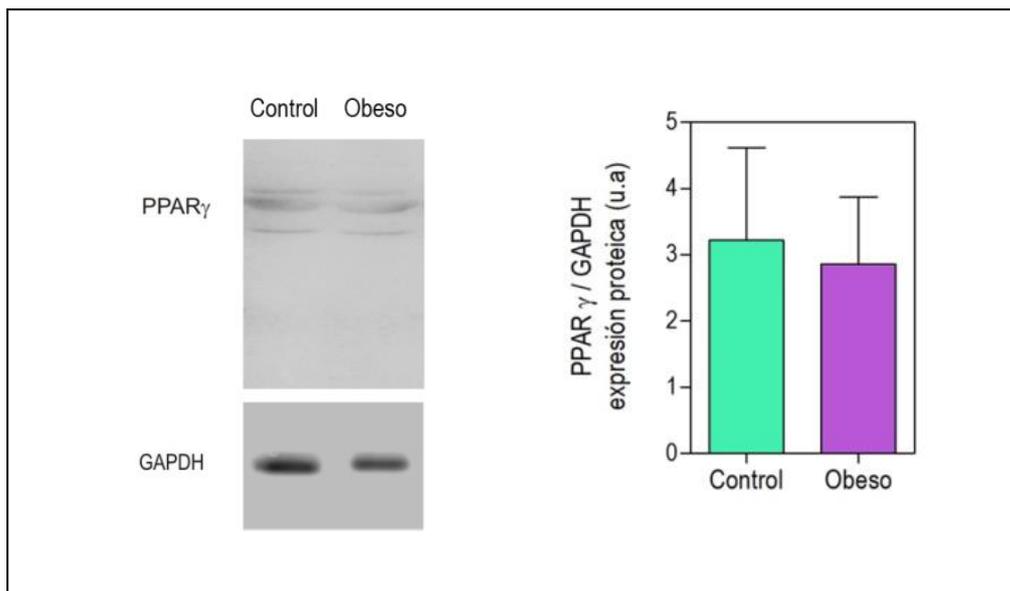


Figura 45: Expresión proteica relativa del receptor de proliferación peroxisomal gamma (PPAR γ) en útero de ratas control y obeso pre-gestantes. Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) fue utilizado como control de carga. **Panel izquierdo:** Imagen representativa del western blot. **Panel derecho:** Análisis densitométrico del western blot. Los datos se expresan como la media \pm S.E.M.; n = 5 / grupo.

2 La obesidad provoca un aumento de la proliferación celular a nivel uterino.

Estudios previos han demostrado que la obesidad es un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer endometrial (Setiawan *et al.* 2013), es por lo que resultó de interés evaluar si la obesidad altera la proliferación celular en el útero de la rata pre-gestante.

Como se observa en la figura 46, la inmunodetección de PCNA reveló que la proliferación celular varió entre animales control y obesos como así también dentro de los compartimentos uterinos.

Los mayores índices de proliferación fueron detectado en las células epiteliales luminales, seguidas de las células estromales, tanto en el útero de las ratas control como obesas; mientras que el epitelio glandular fue el que presentó una menor cantidad de células en proliferación en ambos grupos (Figura 47).

Los úteros de ratas obesas presentaron un mayor número de células en proliferación en el epitelio luminal y en el estroma comparado con los controles ($p < 0.01$ y $p < 0.05$, respectivamente; Figura 47), demostrando que la actividad proliferativa uterina se encuentra aumentada en los animales obesos.

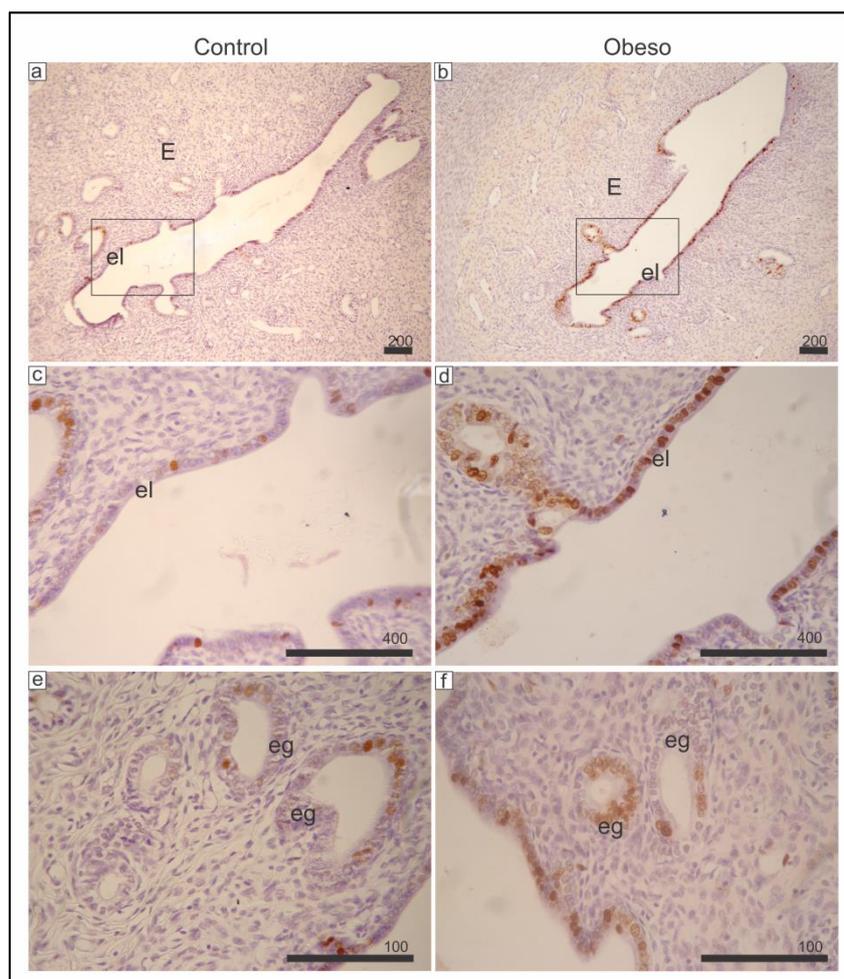


Figura 46: Inmunodetección del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) en tejido uterino de ratas control (a, c y e) y obesas (b, d y f) pre-gestantes. La inmunomarca (evidenciada como núcleos de color marrón) fue detectada en el epitelio glandular (eg) y epitelio luminal (el) así como también en el estroma (E). Las escalas se grafican con las barras y se expresan en μm .

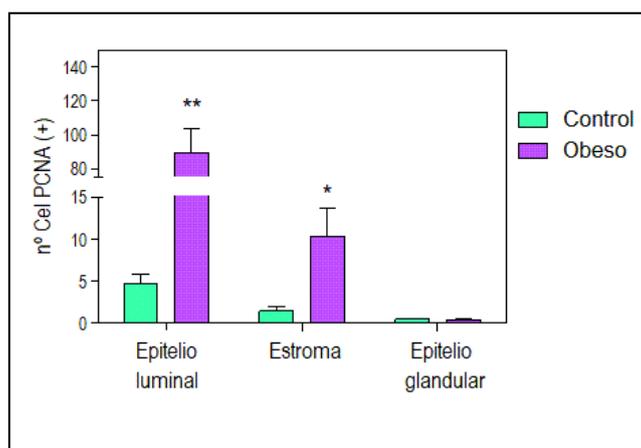


Figura 47: Evaluación del número de células inmunoreactivas contra el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA +) en los diferentes tipos celulares (estromales y epiteliales de tipo luminales o glandulares) presentes en los úteros de ratas control (barras verdes) y obesas (barras violetas). Los resultados se expresan como media \pm SEM ($n = 5/\text{Grupo}$). * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ con respecto al grupo control.

El siguiente objetivo fue evaluar si ese aumento en las tasas de proliferación celular se veía asociado con alteraciones en la histología y/o en los pesos uterinos.

Se detectó que el peso uterino relativo fue similar entre animales controles y obesas (Figura 48).

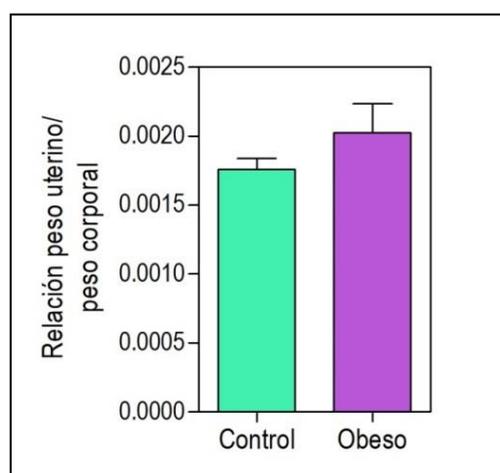


Figura 48: Relación entre el peso uterino y el corporal de los animales del grupo control (barras verdes) y obeso (barras violetas) pre-gestantes. Los resultados se expresan como media \pm S.E.M; n = 8/ Grupo.

A continuación se realizó una examinación microscópica de las secciones uterinas. Los epitelios luminales y los tipos de glándulas fueron analizados utilizando el criterio de Scully (Scully *et al.* 1994; Gunin *et al.* 2001); detectándose que todos los endometrios eran aspecto normal. Los úteros provenientes tanto de ratas control como obesas presentaron un epitelio luminal de tipo cubico a cilíndrico simple (Figura 49 c y d) y glándulas de tipo normales delimitadas por un epitelio de tipo cúbico simple (Figura 49 (e y f)).

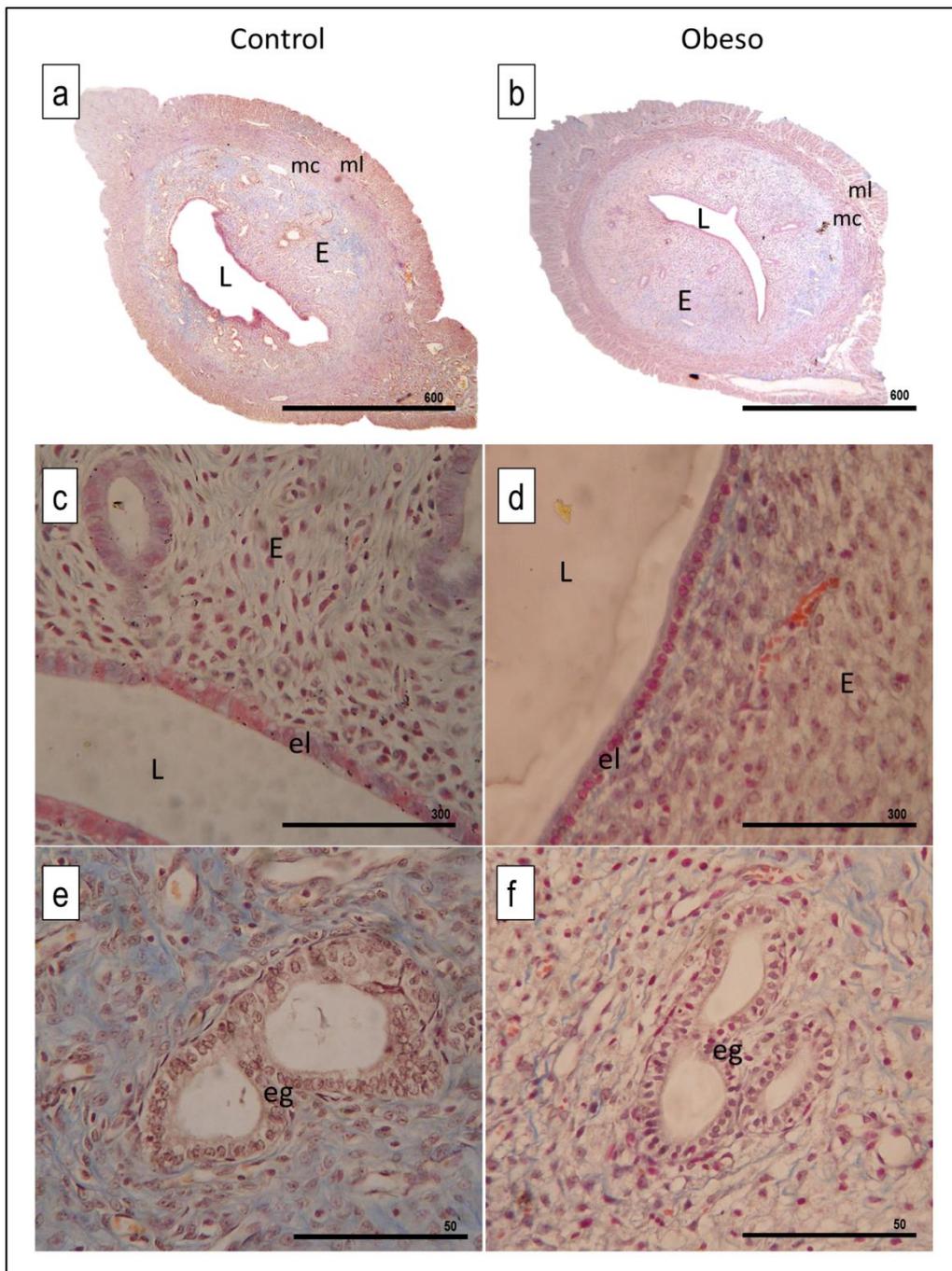


Figura 49: Secciones de úteros coloreados con tricrómico de Masson representativas de animales control (a, c y e) y obesos (b, d y f). (a y b) imágenes topográficas de los úteros; (c y d) observe el epitelio luminal simple de tipo cubico a cilíndrico; (e y f) detalle de glándulas de tipo normal rodeadas por un epitelio de tipo simple cubico. E, estroma, eg: epitelio glandular; Le: epitelio luminal, mc (musculatura lisa circular), ml (musculatura lisa longitudinal). Las escalas se grafican con las barras y se expresan en μm

El grosor endometrial (Figura 50 A) así como el miometrial (Figura 50 B) fueron similares en úteros de ratas control y obesas; sin verse alterada tampoco la relación entre ambos (Figura 50 C).

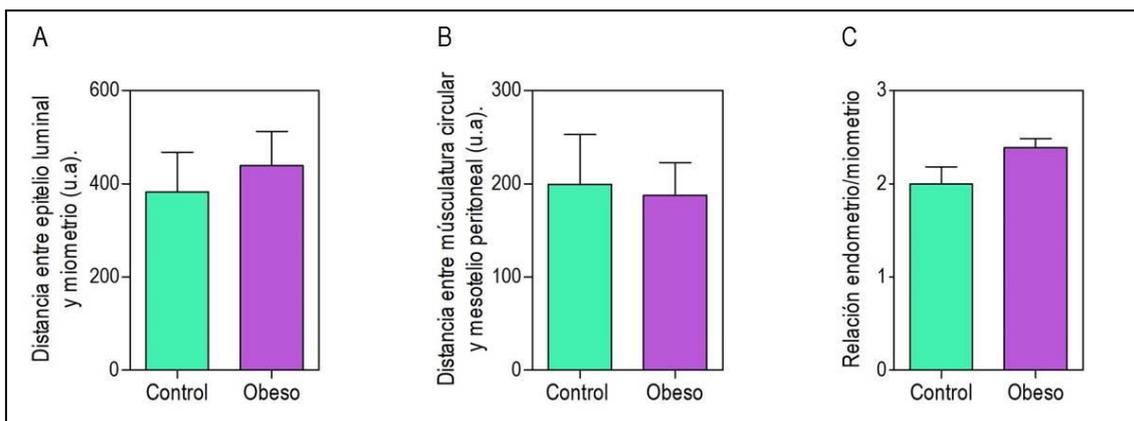


Figura 50: (A) Grosor endometrial (B) Grosor miometrial (C) Relación entre el grosor endometrial y miometrial, medidos en secciones uterinas de animales control (barras verdes) y obesos (barras violetas) en pre-gestación. Los resultados se expresan como media \pm S.E.M ; n = 5/ Grupo.

Estos resultados demuestran que la obesidad genera una alteración en la proliferación celular uterina sin que esta se vea traducida en aumento del grosor endometrial, miometrial, ni del peso uterino.

3 La expresión uterina del receptor adrenérgico $\beta 2$ se ve disminuida en animales pre-gestantes como consecuencia de la obesidad.

Como se describió en el capítulo II de este trabajo de tesis, la obesidad materna produjo, en 4.5 gd, un aumento en la expresión uterina del $\beta 2$ AR asociada con alteraciones en la actividad contráctil uterina. El próximo objetivo fue determinar si dichas alteraciones se establecen antes de la concepción o si lo hacen durante la gestación.

En primera instancia se realizó un ‘screening’ de las diferentes isoformas de los AR en el útero de ratas controles y obesas pre-gestantes (Figura 51).

Las isoformas detectadas fueron: $\alpha 1A$ AR, $\alpha 2A$ AR, $\alpha 2B$ AR, $\alpha 2C$ AR y $\beta 2$ AR; todas ellas presentes tanto en el útero de ratas control como obesas. No se detectó la expresión génica de las isoformas: $\alpha 1B$ AR, $\beta 1$ AR y $\beta 3$ AR ni en úteros control ni en los provenientes de ratas obesas. Observándose que $\beta 2$ AR es la isoforma dominante tanto en el útero de animales control y obesos pre-gestantes, coincidentemente con lo hallado en 4.5 gd.

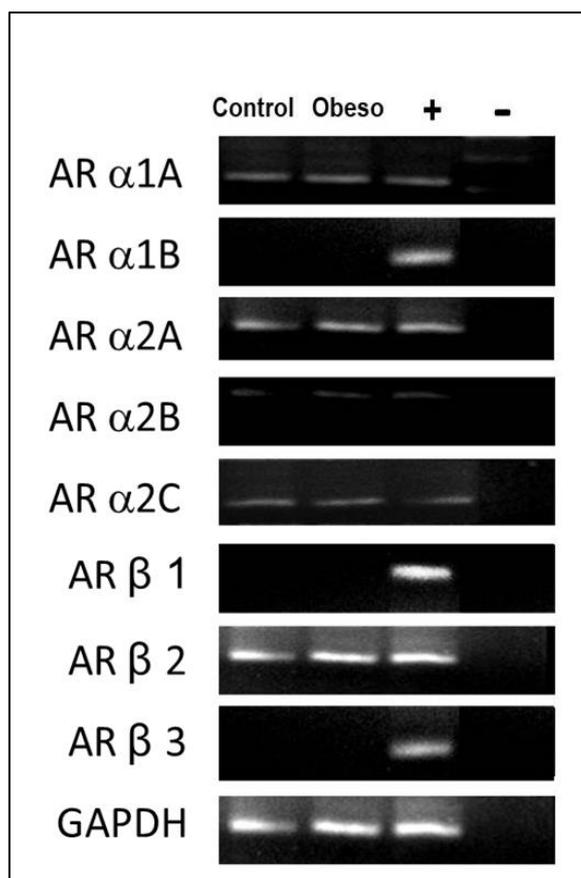


Figura 51: Imagen representativa de la electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados por PCR correspondientes a las diferentes isoformas de receptores adrenérgicos (AR) en úteros de ratas control y obesas pre-gestantes. Glicer aldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) fue utilizado como control de expresión constitutiva. +: Control positivo; -: Control negativo; n = 5 / Grupo.

Al cuantificar los niveles del mRNA uterinos que codifican para el $\beta 2$ AR, se encontró que éstos fueron inferiores en el grupo obeso que en el grupo control ($p < 0.001$, Figura 54).

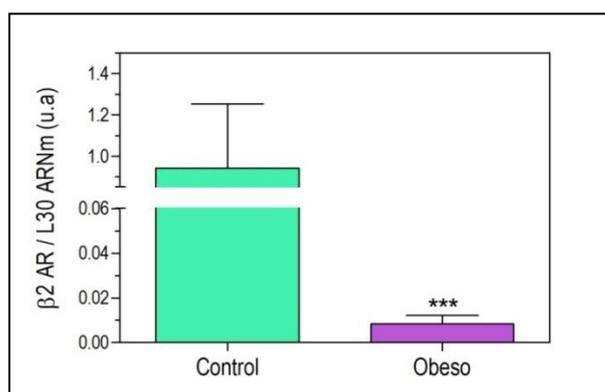


Figura 52: Expresión uterina relativa del ARNm que codifica para el receptor adrenérgico $\beta 2$ ($\beta 2$ AR) en ratas control y obesas pre-gestantes. El ARNm que codifica para la proteína ribosomal L30 fue utilizado como control de expresión constitutiva. Los datos se expresan como la media \pm S.E.M.; n=8/Grupo.; ***p < 0.001 respecto al grupo control

Al evaluar la expresión proteica de dicho receptor, se encontró que los úteros de ratas obesas presentaron niveles inferiores de $\beta 2$ AR que los controles ($p < 0.01$, Figura 55).

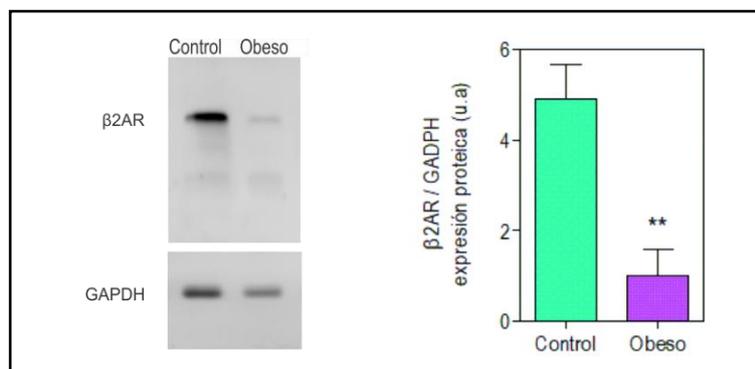


Figura 53: Expresión proteica relativa del receptor adrenérgico $\beta 2$ ($\beta 2$ AR) en úteros de ratas control y obesas pregestantes. Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) fue utilizado como control de carga. **Panel izquierdo:** Imagen representativa del western blot. **Panel derecho:** Análisis densitométrico del western blot. Los datos se expresan como la media \pm S.E.M.; $n = 5$ / Grupo; *** $p < 0.001$ respecto al grupo control.

La inmunolocalización del $\beta 2$ AR permitió determinar que, en el estadio de pregestación, este receptor se expresa mayoritariamente en la musculatura uterina, tanto longitudinal como circular, y en menor medida en el epitelio que rodea el lumen uterino y en el estroma; observándose un patrón similar tanto en animales control como obesos (Figura 54).

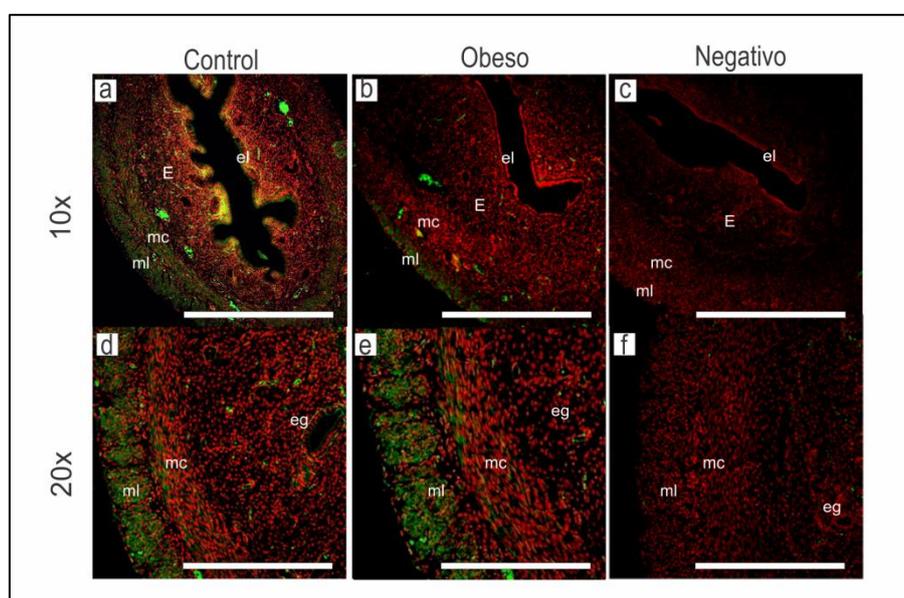


Figura 54: Localización del receptor adrenérgico tipo $\beta 2$ ($\beta 2$ AR) en el útero de ratas control y obesas pre-gestantes. El color verde corresponde al $\beta 2$ AR dado que se utilizó Alexa Fluor 488 como fluoróforo. Los núcleos se visualizan en color rojo dado que fueron marcados con yoduro de propidio. En el control negativo se omitió el uso de anticuerpo primario. E, estroma; Le, epitelio luminal; Ge, epitelio glandular; Lm, capa muscular longitudinal; Cm, capa muscular circular. Barra= 500 μ m; $n=5$ /Grupo.

Estos resultados permiten concluir que la obesidad altera la expresión uterina del $\beta 2$ AR desde antes de la concepción, disminuyendo su expresión tanto a nivel transcripcional como traduccional, sin modificar su localización en dicho órgano.

4 La obesidad no modifica la expresión uterina del receptor 3 del ácido lisofosfatídico (Lpa_3)

Debido a que en 4.5 gd los úteros de animales obesos presentaron una disminución en la expresión génica del Lpa_3 y dada la relación entre Lpa_3 y los $\beta 2$ AR, el siguiente objetivo fue determinar si la expresión de Lpa_3 se ve alterada desde antes de la concepción como consecuencia de la obesidad.

Como se observa en la figura 55, los niveles del mRNA que codifica para el Lpa_3 fueron similares en úteros de ratas control y obesas pre-gestantes.

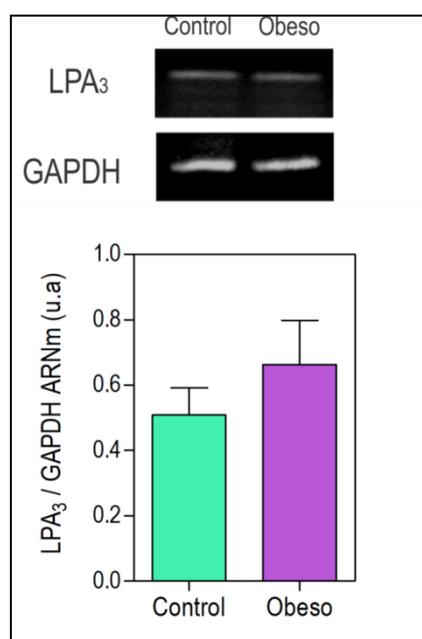


Figura 55: Expresión génica del receptor 3 del ácido lipofosfatídico (Lpa_3) en úteros de animales control y obesos pre-gestantes. **Panel superior:** Imagen representativa de la electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificador por PCR. **Panel inferior:** Análisis densitométrico de los productos de PCR. Los valores se expresan en unidades arbitrarias (u.a) como medias \pm S.E.M. de la densidad óptica específica normalizada contra gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH); n=5/Grupo.

5 La obesidad no modifica la actividad contráctil uterina espontánea antes de que se produzca la concepción.

Habiendo encontrado niveles uterinos más bajos de $\beta 2$ AR en ratas obesas pre-gestantes y siendo este un factor clave que estimula la relajación del miometrio, el siguiente

objetivo fue analizar si la obesidad altera la actividad contráctil uterina en ratas antes de la concepción.

En la figura 56 A se muestran trazos representativos de los patrones de contracción espontánea evaluados en úteros de ratas control y obesas en pre-gestación.

A partir de esos trazos se calcularon la amplitud y la frecuencia de las contracciones, así como también la actividad integral (área bajo la curva). Como se ilustra en la Figura 56, el análisis de la actividad contráctil espontánea reveló que la obesidad no alteró la amplitud (Figura 56 B), la frecuencia (Figura 56 C) ni la actividad integral de las contracciones espontáneas del útero pre-gestante (Figura 56 D).

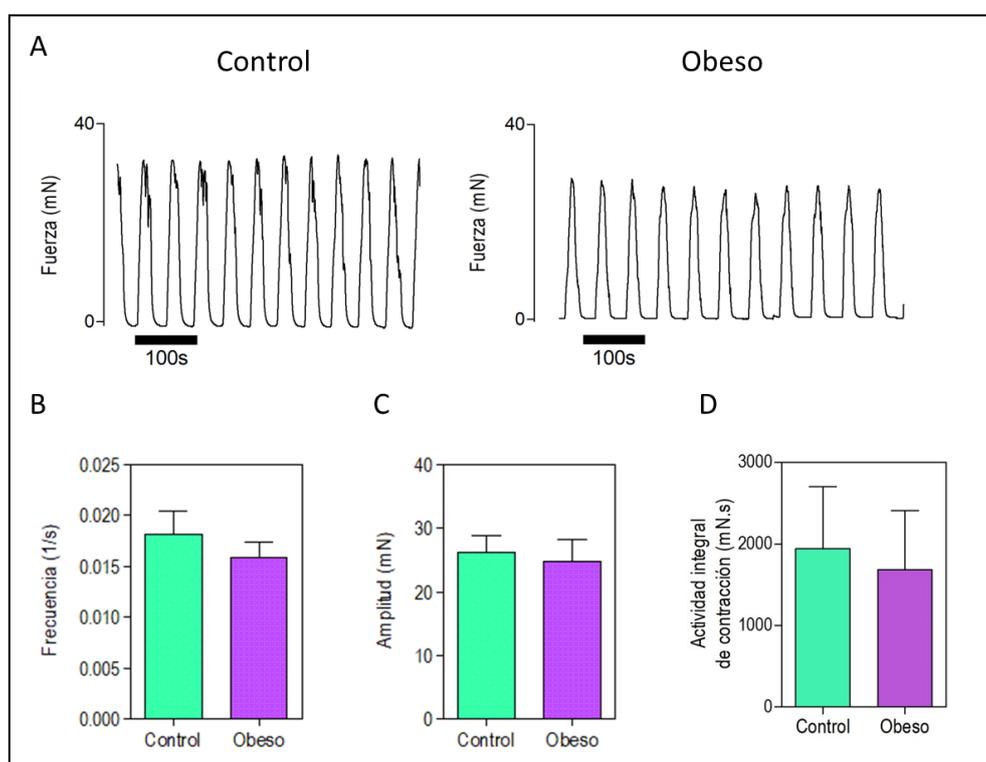


Figura 56: Efecto de la obesidad sobre la actividad contráctil uterina espontánea evaluada durante 20 minutos en ratas pre-gestantes. (A) Trazos representativos de los patrones de contracción evaluados en úteros de ratas control y obesas. El análisis de dichas curvas incluyó: (B) frecuencia, (C) amplitud y (D) actividad integral de contracción (área bajo las curvas de fuerza en función del tiempo). Los datos se expresan como la media \pm S.E.M.; n = 5/Grupo.

6 La obesidad genera, antes de la concepción, una menor sensibilidad uterina a Salbutamol, agonista selectivo del receptor adrenérgico β_2 .

El próximo objetivo fue determinar si la cadena de señalización desencadenada por el β_2 AR tiene la capacidad de ser activada en los animales obesos pre-gestantes, a pesar de presentar éstos una disminución en la expresión de dichos receptores. Para ello, se evaluó la respuesta uterina a salbutamol, un agonista selectivo de β_2 AR.

En la figura 57 se muestran trazos representativos de los patrones de contracción uterinos en respuesta a dosis acumulativas de Salbutamol (0.05-5000 ng/ml) de ratas control y obesas antes de que ocurra la concepción; donde puede evidenciarse que tanto los úteros de los animales control como obesos respondieron al estímulo de salbutamol, disminuyendo su actividad contráctil.

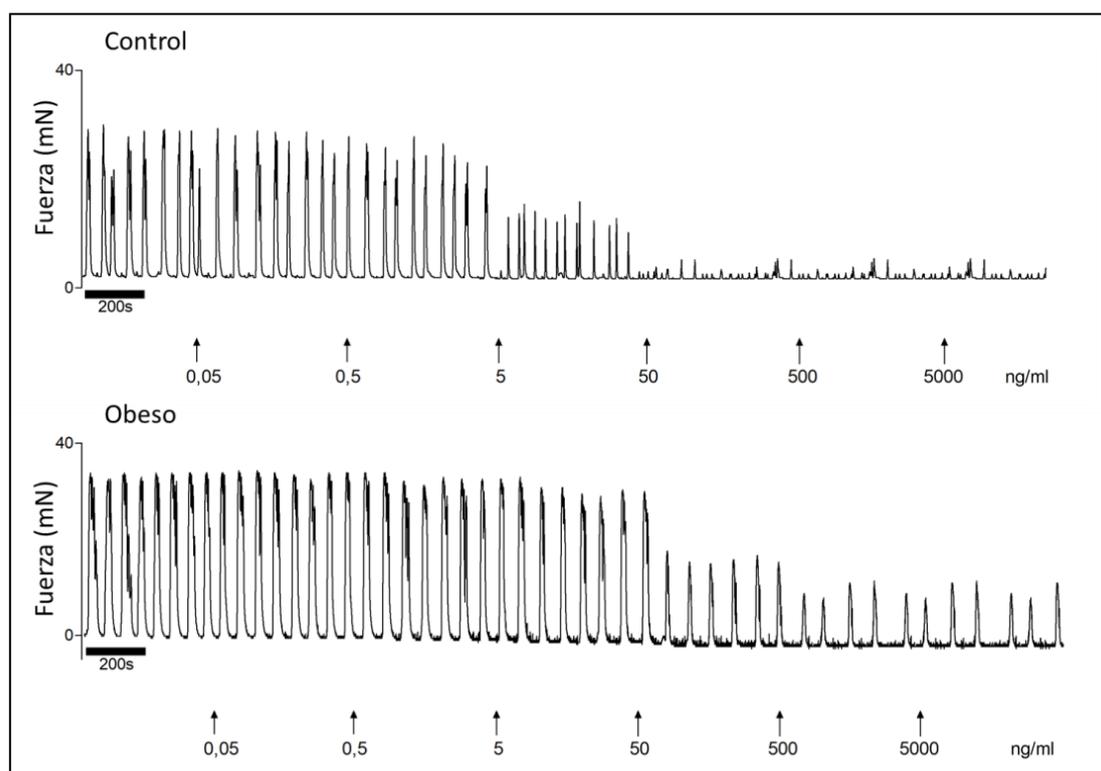


Figura 57: Trazos representativos de patrones de contracción uterina en respuesta a dosis acumulativas de Salbutamol (0.05-5000 ng/ml) evaluados en ratas control (**panel superior**) y obesas (**panel inferior**) pre-gestantes.

Se calcularon la amplitud, la frecuencia y la actividad integral de las curvas en respuesta a salbutamol, relativizándolas a las evaluadas espontáneamente (Figura 58).

En el grupo control, salbutamol disminuyó significativamente la amplitud de las contracciones respecto de la espontánea desde la dosis 0.5 ng/ml, manteniéndose para todo el rango de dosis evaluado: 5, 50, 500 y 5000 ng/ml ($p < 0.001$; Figura 58A).

En el grupo obeso la disminución significativa de la amplitud se evidenció al utilizar 50 ng/ml de salbutamol ($p < 0,01$), manteniéndose para las dosis sucesivas: 500 y 5000 ng/ml ($p < 0,001$; Figura 58 A).

Cuando se compararon las amplitudes entre los animales control y los obesos para cada concentración de salbutamol, éstas resultaron mayores en los úteros de ratas obesas que en los controles para las concentraciones 5 y 50 ng/ml de salbutamol ($p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente; Figura 58).

Al evaluar las frecuencia de contracción, se observó una disminución significativa, respecto de la actividad contráctil espontánea, en respuesta a 50, 500 y 5000 ng/ml de salbutamol en el grupo control ($p < 0.001$). Mientras que en el grupo obeso, salbutamol no modificó la frecuencia de contracción (Figura 58 A).

Cuando se compararon las frecuencias para cada concentración de salbutamol, se observó que éstas fueron significativamente mayores en el grupo obeso en comparación a la del grupo control a partir de la concentración 50 ng/ml, manteniéndose para las sucesivas de 500 ng/ml y 5000 ng/ml ($p < 0.001$, $p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente).

En el grupo control, salbutamol produjo una disminución en la actividad contráctil integral uterina para todas las concentraciones evaluadas (0,05 a 5000 ng/ml) respecto de la espontánea ($p < 0,00$); mientras que en el grupo obeso esto fue evidenciado a partir de los 5 ng/ml de salbutamol ($p < 0,01$) (Figura 58 C).

La actividad integral fue significativamente menor en los úteros de ratas obesas que en controles cuando se utilizaron 0,05; 0,5; 5 y 50 ng/ml de salbutamol ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ y $p < 0,001$, respectivamente).

El hecho de que los úteros de los animales obesos pre-gestantes requirieran de mayores concentraciones de salbutamol para inhibir su contracción pone en evidencia que la obesidad genera una menor sensibilidad de los úteros a este estímulo de relajación.

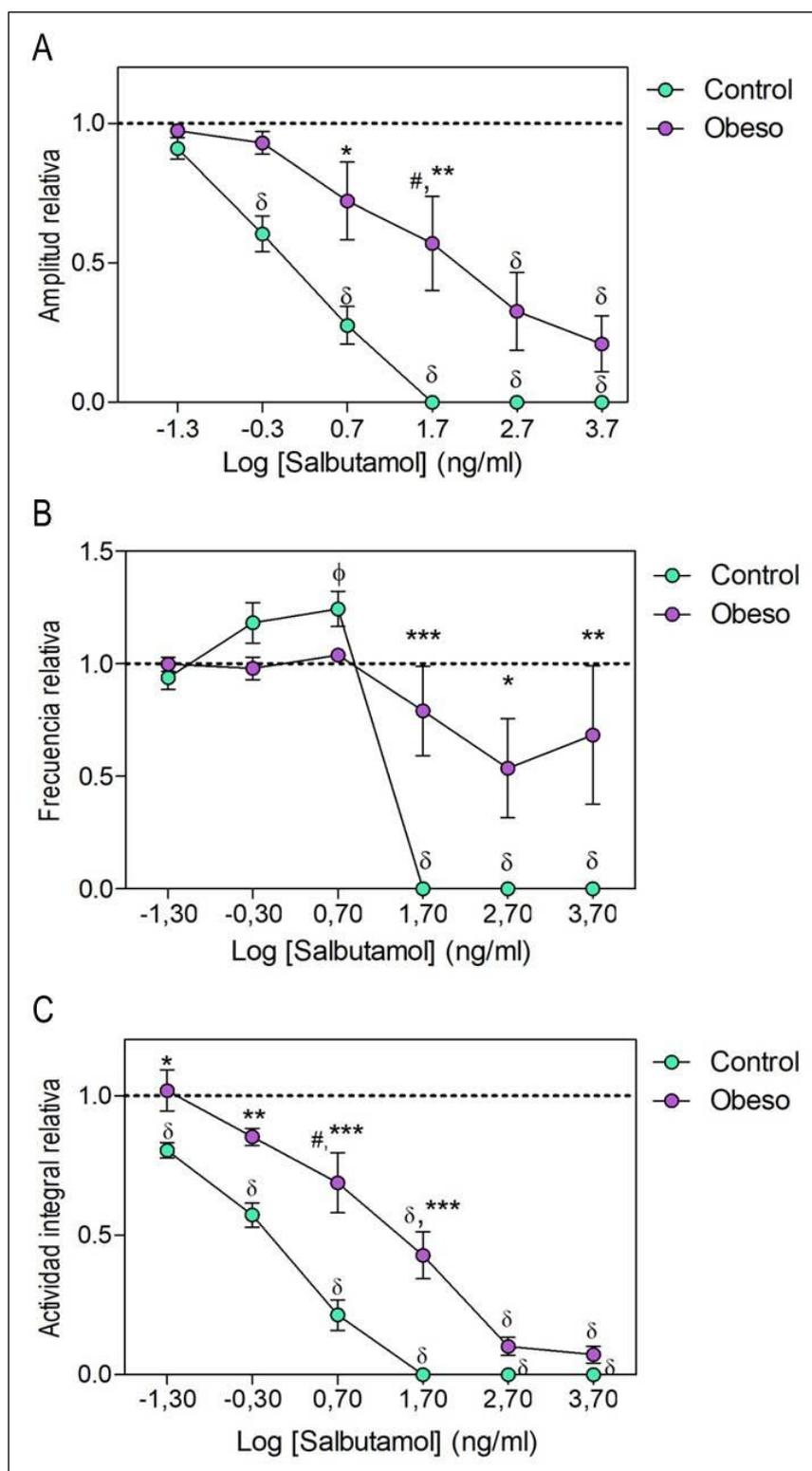


Figura 58: Análisis de la amplitud, frecuencia y actividad integral de contracción en función del logaritmo de la concentración de salbutamol (0.05-5000 ng/ml) en úteros de animales control y obesos pre-gestantes. El efecto de la dosis de Salbutamol fue analizado durante 7 minutos y normalizados a la amplitud espontánea. Los datos se expresan como la media \pm S.E.M.; $n=5$ /Grupo; * $p<0.05$, ** $p<0.01$ y *** $p<0.001$ indican diferencias significativas entre grupos control y obeso para la misma concentración de agonista, mientras que ϕ $p<0.05$ # $p<0.01$ δ $p<0.001$ indican diferencias significativas en comparación con la actividad espontánea medida de cada grupo.

Conclusión parcial III:

En este capítulo se demuestra que la obesidad induce resistencia a la insulina uterina por mecanismos que involucran la disminución en la expresión génica del InsR y el aumento en los niveles uterinos de Hif1 α en animales pre-gestantes.

Además de esas disrupciones, se comprobó que la obesidad incrementa la proliferación celular en los úteros sin ello reflejarse en cambios en el índice útero-somático como así tampoco en el grosor endometrial/miometrial.

Por otro lado, la actividad contráctil uterina espontánea no se vio modificada como consecuencia de la obesidad. Pese a ello, los úteros de ratas obesas presentaron una menor sensibilidad a salbutamol, un agonista de $\beta 2$ AR que induce la relajación miometrial. Esta menor sensibilidad resulta coherente con la disminución en la expresión uterina de $\beta 2$ AR detectada en los animales obesos.

Por tanto, los resultados aquí descriptos demuestran que la obesidad altera el ambiente uterino afectando su metabolismo y funcionalidad antes de que ocurra la concepción, lo que sugiere que estos animales enfrentarían una gestación en condiciones no óptimas

Discusión

Combatir la obesidad es actualmente, sin duda, uno de los retos más grandes que se enfrentan a nivel mundial debido al inminente aumento de su prevalencia en las últimas décadas (Swinburn *et al.* 2004). Esta patología afecta tanto a países desarrollados como en desarrollo, sin ser América Latina, y en particular Argentina, excepciones a ello (Popkin y Reardon 2018; Ministerio de Salud de la Nación 2013).

La obesidad se asocia a numerosos problemas de salud, incluyendo aquellos relacionados con la salud reproductiva. En relación a ello, se ha descrito que la obesidad produce alteraciones del proceso ovulatorio, vinculándose muchas veces con la anovulación (Giviziez *et al.* 2016). Incluso en ausencia de disfunción ovulatoria, las mujeres obesas aumentan el riesgo de sufrir sub-fertilidad (Antoniotti *et al.* 2018). Esto sugiere que la funcionalidad del endometrio de esas pacientes se ve alterado como consecuencia de esta patología, desconociéndose aún las posibles causas.

Además, se ha demostrado que, durante las primeras etapas de la vida, la exposición intrauterina a un entorno obesogénico causa modificaciones epigenéticas en la descendencia que aumentan la susceptibilidad de ese individuo a desarrollar enfermedades como diabetes tipo 2, hipertensión, obesidad y síndrome metabólico al alcanzar la adultez (Neri y Edlow 2016). Es por ello que serían vastos los beneficios si pudieran prevenirse dichas alteraciones gestacionales y de programación fetal intrauterina asociadas a la obesidad materna. Así, profundizar en el conocimiento general de dicha patología, investigando los mecanismos implicados en la alteración del ambiente intrauterino como consecuencia de la obesidad materna, resulta fundamental para el avance en la resolución de dicha problemática de salud pública.

Por todo lo expuesto, el objetivo general de este trabajo de tesis fue estudiar los efectos de la obesidad materna pre-concepcional sobre el desarrollo de la gestación. En particular se estudió si la obesidad afecta el desempeño reproductivo femenino y si el mecanismo a través del cual lo hace involucra alteraciones en el ambiente intrauterino y/o en el proceso de implantación embrionaria. Evaluándose, además, los mecanismos moleculares involucrados en dichas disrupciones.

Numerosos son los modelos animales que se han desarrollado a fines de estudiar distintos aspectos de la obesidad (Lutz y Woods 2013; Kleinert *et al.* 2018). En el presente trabajo se utilizó un modelo de obesidad inducida por CAF. Esta dieta refleja, en gran medida, la variedad de alimentos altamente palatables y de alto contenido energético prevaletentes en la sociedad occidental, que se encuentra fuertemente asociada a la actual pandemia de obesidad (Akyol *et al.* 2009; Fernandes de Melo *et al.* 2018).

Se ha descrito que CAF es capaz de inducir hiperfagia voluntaria en ratas (Naim et al. 1985), fenómeno característico y exclusivo de la alimentación humana (Sclafani y Springer 1976; Pandit *et al.* 2012). En concordancia con estos estudios, en el presente trabajo se ha comprobado el desarrollo de hiperfagia voluntaria en ratas hembras como consecuencia de la administración de CAF durante 60 días; y el consecuente aumento en el peso corporal de los animales. Previamente habíamos demostrado que los niveles séricos de colesterol y triglicéridos son normales en dichos animales pero, sin embargo, cursan con hiperglucemia (Bazzano *et al.* 2015). Esto último ha sido ampliamente descrito en la bibliografía, en donde se demuestra que la obesidad se asocia, muchas veces, con una menor capacidad de la insulina de regular el metabolismo de la glucosa en los tejidos periféricos (Boden 1997). Además, otros grupos también han descrito un desequilibrio en la homeostasis de la glucosa e insulina como consecuencia de CAF (Boden 1997; Mali *et al.* 2013). En el presente trabajo se verificó, además, que en las ratas alimentadas con CAF desarrollan intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina. Conocer el perfil metabólico de los animales obesos permitió concluir que el modelo de obesidad inducido por CAF utilizado en el presente trabajo representa a la subpoblación de mujeres obesas que cursan esta patología asociada a hiperglucemia e insulino resistencia. En relación a ello, la OMS alerta que una de las grandes consecuencias de la obesidad son sus implicancias en el desarrollo de hiperglucemia e incluso diabetes, siendo alarmante, a nivel mundial, sus prevalencias conjuntas (Chan. 2016).

En trabajos previos de nuestro laboratorio, se ha demostrado que la obesidad inducida por CAF disminuye la reserva folicular ovárica y altera los ciclos estrales, el proceso ovulatorio y el metabolismo glucídico a nivel ovárico (Bazzano *et al.* 2015; Bazzano *et al.* 2017). Es por ello que en el presente trabajo resultó de interés evaluar si dichas alteraciones ováricas generan alteraciones en el desempeño reproductivo. En efecto, nuestros resultados demuestran que la obesidad genera un retraso en alcanzar la concepción, resultando esto coherente con la irregularidad en los ciclos estrales descrita anteriormente en dichos animales (Bazzano *et al.* 2015). En concordancia con estos hallazgos, se ha visto que el tiempo para alcanzar el embarazo es mayor en mujeres que presentan sobrepeso y obesidad que aquellas de peso normal (Maheshwari 2010). Esto no es un hecho menor dado que actualmente, y principalmente en las sociedades industrializadas, el interés por la maternidad se establece en edades avanzadas (Lean *et al.* 2011) y por lo tanto, el tiempo es una nueva limitante al momento de buscar un embarazo (Ferrazzi *et al.* 2019).

Además, en el presente trabajo demostramos que la obesidad genera una disminución en las tasas de fertilidad. Estos hallazgos coinciden con los descritos por otros autores tanto en roedores (Skaznik *et al.* 2016) como en humanos (Kasum *et al.* 2017; Rittenberg *et al.* 2011).

Respecto de aquellas hembras que alcanzaron la gestación, aquí describimos que el peso corporal de las gestantes obesas fue superior al de las controles durante el transcurso de la gestación a pesar de haberse alimentado de manera similar durante este período; evidenciándose así una mayor susceptibilidad de las gestantes obesas a la ganancia exacerbada de peso corporal y resaltando la importancia del peso materno al momento de la concepción. Además de esa exacerbada ganancia de peso materno durante la gestación, encontramos que la obesidad materna genera macrosomía fetal; demostrándose así que la obesidad materna pre-concepcional afecta el desarrollo fetal incluso frente a un entorno nutricional normal durante el transcurso de la gestación. Si bien históricamente se asoció la macrosomía fetal principalmente a madres con diabetes mellitus gestacional, estudios recientes demuestran que la obesidad materna se asocia con macrosomía infantil aun cuando la obesidad no cursa con diabetes (Graves *et al.* 2015). La macrosomía es un factor de riesgo de sufrir complicaciones obstétricas y trastornos metabólicos en la vida adulta (Araujo *et al.* 2017) como el síndrome metabólico (Hermann *et al.* 2010), la diabetes mellitus tipo 2 (Wei *et al.* 2003) y la obesidad (Sørensen *et al.* 1997; Ehrenberg *et al.* 2004). De esa manera, el fenotipo obeso parecería perpetuarse dado que los hijos de madres obesas presentarán alteraciones metabólicas en la adultez que transmitirán a las futuras generaciones.

Los hallazgos hasta aquí discutidos condujeron a hipotetizar que la obesidad materna pre-concepcional modifica el entorno intrauterino al que está expuesto el feto durante la gestación, condicionando así su desarrollo y aumentando el riesgo de que éste desarrolle el fenotipo obeso en la adultez. Al respecto, demostramos que, efectivamente, la obesidad pre-concepcional altera el ambiente intrauterino dado que induce el desarrollo de resistencia a la insulina por parte del útero. Este resultado concuerda con observado por nuestro grupo de investigación, previamente, a nivel ovárico (Bazzano *et al.* 2017).

El desarrollo de resistencia a la insulina a nivel uterino no es un hecho menor dado que este órgano presenta un requerimiento alto de energía necesario para mantener su actividad (Frolova y Moley 2011a; Zhang *et al.* 2016). Aquí se demuestra, por primera vez, que los mecanismos a través de los cuales la obesidad genera resistencia a la insulina uterina involucran la disminución de la expresión génica del *InsR*, sin alterar la de *Glut-1* y *Glut-4*. Cabe aclarar que dado que la insulina controla el tráfico de GLUT-4, con nuestros resultados no se puede descartar que en los animales obesos, el tráfico de GLUT-4 no esté alterado a pesar de que su expresión génica no se vea alterada. Nuevos experimentos están siendo desarrollados con el fin de comprobarlo.

La sensibilidad a insulina está controlada por numerosos factores entre los que se destaca un estado de hipoxia celular, condición frecuentemente observada en obesidad debido a la

excesiva deposición del tejido adiposo (Halberg *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2011; Wong *et al.* 2013; Kim *et al.* 2006). Se sabe que la hipoxia promueve la expresión del factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF) tanto a nivel genético como a nivel proteico en diversos sistemas (Quaegebeur *et al.* 2017) y que la isoforma HIF1 α se estabiliza en condiciones de hipoxia y es rápidamente degradado en normoxia, mientras que HIF1 β se expresa constitutivamente (Semenza 2004). De esta manera, HIF1 α funciona como el principal regulador de la respuesta homeostática celular y sistémica a hipoxia mediante la activación de la transcripción de muchos genes. Entre ellos se incluyen aquellos involucrados en el metabolismo energético, la angiogénesis, la apoptosis y otros genes cuyos productos proteicos aumentan el suministro de oxígeno o facilitan la adaptación metabólica a la hipoxia (Semenza 2004; Maybinet *al.* 2018).

El hecho de encontrar, aquí, más alta la expresión de *Hif-1 α* en el útero de los animales obesos que en los controles demuestra, por primera vez, que la obesidad induce hipoxia en el útero. Por tanto, la inducción de hipoxia uterina parece ser uno de los mecanismos por los cuales la obesidad induce insulino resistencia local que se da, probablemente, como consecuencia de la disminución en los niveles uterinos del *InsR* detectado en estos animales.

El papel de la vía de señalización mediada por HIF en la tumorigénesis y la respuesta clínica a los tratamientos anti tumorales han sido bien establecidos debido a las áreas de baja oxigenación que muchos tumores presentan y la consecuente hipoxia intra-tumoral (Semenza 2010). La expresión elevada de HIF 1 α ha sido correlacionada con el riesgo de mortalidad en diversos tipos cáncer, entre los que se encuentra el de útero (Semenza 2010). En relación a ello, se sabe, además, que la obesidad aumenta el riesgo de contraer cáncer de endometrio (Setiawan *et al.* 2013). Por todo lo expuesto resultó de interés evaluar la actividad proliferativa en úteros de animales obesos. Nuestros resultados muestran que la obesidad aumenta las tasas de proliferación en células epiteliales luminales como en células estromales endometriales concomitantemente con el incremento en los niveles uterinos de *Hif1 α* . Estos hallazgos pueden ser indicativos de un aumento en la vulnerabilidad del tejido endometrial a desarrollar cáncer en los animales obesos. Sin embargo, el aumento en las tasas de proliferación podría ser compensado por un aumento en las tasas de apoptosis y, como consecuencia de ello, el tejido uterino conservaría su homeostasis. De hecho, aquí observamos que la obesidad no altera ni el grosor endometrial y miometrial ni el peso uterino. Complementar este estudio con la identificación de marcadores de cáncer endometrial, como así también, evaluar la apoptosis tisular permitirían ser más concluyentes al respecto. Nuevos experimentos están siendo diseñados para tal fin.

El metabolismo de la glucosa y la sensibilidad a la insulina está controlada, además, por otros factores de transcripción. En este sentido, PPAR γ se reconoce como un regulador maestro de la homeostasis de la glucosa; es por ello que agonistas de PPAR γ , como las tiazolidinedionas, pioglitazona y rosiglitazona, son prescritos actualmente como anti-diabéticos y sensibilizadores de la insulina (DeFronzo 1999).

Aquí se detectó que la expresión proteica de PPAR γ no se ve afectada a nivel uterino como consecuencia de la obesidad, sugiriendo que este factor de transcripción no sería el que regula la insulino resistencia uterina en nuestro modelo experimental. Sin embargo, que los niveles de PPAR γ no estén alterados no implica que su función no lo esté. Complementar el presente estudio con la evaluación de ligandos endógenos de PPAR γ , como también de los factores río debajo en su cadena de señalización, permitiría poder ser más concluyente al respecto.

Todas las evidencias discutidas hasta aquí demuestran que la obesidad afecta el ambiente uterino previo a que ocurra la concepción, ambiente que, si esta ocurriera impactaría en el desarrollo embrionario y fetal (Barnes 2000). Así, las alteraciones uterinas hasta aquí descritas en ratas obesas pudieron ser responsables no sólo de la disminución de la fertilidad de dichos animales, sino también contribuir en las alteraciones en el crecimiento fetal que describimos anteriormente.

Al momento de evaluar el impacto de la obesidad materna sobre el desarrollo fetal, hubo un hallazgo que llamó poderosamente nuestra atención: la distribución fetal uterina se ve alterada en ratas obesas en 18.5 gd. En este sentido, aquí se demuestra que la obesidad genera una disparidad en el número de fetos presentes en ambos cuernos uterinos y que ésta no es consecuencia de reabsorciones embrionarias post- implantatorias ni de la disparidad en la tasa ovulatoria entre los ovarios de un mismo animal. En vistas de esta evidencia y a fines de establecer cuando se produce el fenómeno que genera dicha disparidad, aquí se estudió la distribución embrionaria en estadios gestacionales más tempranos. Esta fue detectada tanto en post-implantación temprana (5.5 gd) como en pre-implantación (4.5 gd), demostrando que dicha alteración ocurre antes de que los embriones se implanten en el útero.

Por otro lado, el análisis de los embriones durante la pre-implantación evidenció que la obesidad materna pre-concepcional genera un aumento de embriones no viables; y que uno de los cuernos uterinos presenta un mayor número de embriones no viables que el contralateral. Esto explicaría la disparidad en el número de los embriones/fetos presentes entre cuernos uterinos en los animales obesos, observado en los estadios gestacionales posteriores. Al ser estos embriones inviables, no se implantarán y el cuerno uterino que los contiene presentará, entonces, un menor número de embriones/fetos más tardíamente. Ahora bien, lo sorprendente es que pese a dicha disparidad, el número total de embriones

presentes en el útero de ratas obesas es similar del grupo control. Esto ocurre dado que mientras en un cuerno uterino se implantan pocos embriones, el otro cuerno implanta más embriones que los controles. Estos resultados sugieren que frente al déficit implantatorio en uno de los cuernos uterinos, se genera un mecanismo compensatorio por el cual el cuerno uterino contralateral implanta un mayor número de embriones. Así, el número total de embriones resulta similar entre animales control y obesos a pesar de la disparidad en el número de embriones presentes entre ambos cuernos uterinos en animales obesos.

Además de alterarse el número de embriones que se implantan en cada cuerno uterino como consecuencia de la obesidad, durante la realización de esta tesis se detectó la alteración en el espaciamiento entre los sitios de implantación en dichos animales. Se sabe que al llegar al útero los embriones sufren el proceso de “espaciamiento”, durante el cual estos se separan a lo largo del eje longitudinal uterino, impidiendo así que la implantación embrionaria ocurra en un sitio inadecuado. De esta forma se previene el hacinamiento embrionario, evitándose la competencia nutricional y/o la pérdida embrionaria (Chen *et al.* 2013). Ese espaciamiento embrionario a lo largo del eje longitudinal uterino se produce como consecuencia de etapas de contracción-relajación de miometrio, fenómeno conocido como “peristalsis uterina”; quien, además, estimula el transporte útero-tubárico de los embriones (Bulletti y Ziegler 2006; Chen *et al.* 2013). En vistas de haber encontrado que la obesidad altera el posicionamiento embrionario intrauterino y genera un retraso en el descenso de los embriones a la cavidad uterina, el siguiente objetivo fue evaluar la actividad contráctil uterina.

La actividad contráctil espontánea de los úteros se vio incrementada en 4.5 gd como consecuencia de la obesidad pre-concepcional. Los AR son factores claves en la regulación de dicha actividad en diversas especies (Liu *et al.* 1998; Chen *et al.* 2011; Markiewicz y Jaroszewski 2016) dado que la noradrenalina, liberada por los nervios simpáticos, al unirse a ellos, regula la actividad contráctil. Al unirse a los α AR promueve la contracción del miometrio, mientras que al activar los β AR promueve la relajación (Papka *et al.* 1996; Kuijsters *et al.* 2017). Los AR, además, han sido involucrados en la patogénesis de la obesidad ya que controlan la lipólisis y el gasto energético (Lafontan y Berlan 1993; Blaak *et al.* 1993). Se han descrito alteraciones en sus niveles en tejido renal, adiposo e hipotalámico de ratas con obesidad inducida por CAF (Coatmellec-Taglioni *et al.* 2000; Lladó *et al.* 2002; Plut *et al.* 2002). Sin embargo, la expresión de AR en el útero de la rata era desconocida hasta la actualidad, como así también lo era el efecto de la obesidad sobre ellos. En este sentido, el presente trabajo describe por primera vez el patrón de expresión génica de las diferentes isoformas de los AR en el útero de la rata. Las isoformas expresadas en el útero de la rata son las α 1A AR, α 2A AR, α 2B AR, α 2C AR y β 2 AR, en concordancia con lo descrito en útero de ratón por otros autores (Chen *et al.* 2011).

Además, los hallazgos obtenidos permiten concluir que la isoforma $\beta 2$ AR es la dominante en el útero de la rata.

La vía de señalización no clásica del $\beta 2$ AR implica una inter-relación con el *Lpa₃* (Chen *et al.* 2011; Hama *et al.* 2007). Se ha demostrado que, en el útero de ratón, frente a la activación transitoria del $\beta 2$ AR, se produce una disminución del mRNA *LPA₃* (Chen *et al.* 2013), por lo que éste se postula como otro mecanismo por el cual la activación del $\beta 2$ AR induce la relajación miometrial. Además, se ha visto que ratones *knock out* para *LPA3* muestran alteraciones del espaciamiento embrionario, retraso en implantación y reducción del tamaño de la camada (Ye *et al.* 2006). Si bien se ha reportado que la obesidad genera cambios marcados en la expresión de los receptores de LPA en el corazón y en el tejido adiposo blanco en el ratón y en humano (Brown *et al.* 2017), no ha sido descrita su expresión uterina en condiciones de obesidad. Aquí demostramos por primera vez que la obesidad disminuye la expresión génica del *LPA₃* en úteros en 4.5 gd, concomitantemente con una up-regulación en la expresión del $\beta 2$ AR. Debido a esto último, se evaluó la respuesta contráctil de los úteros frente a Salbutamol, agonista selectivo del $\beta 2$ AR; encontrándose que la obesidad genera una mayor sensibilidad al agonista. Esto último resulta coherente con esta produce un aumento los niveles uterinos del receptor $\beta 2$ AR. Sin embargo, a pesar de que éste promueve la relajación miometrial, la contractilidad uterina espontánea se incrementa como consecuencia de la obesidad. Estos resultados llevan a pensar que la obesidad al genera un aumento de la contractibilidad uterina espontánea, se desencadenaría un mecanismo con fines compensatorios a través de la inducción de la expresión del $\beta 2$ AR uterina. La activación de dicha cadena de señalización induciría la relajación miometrial de manera compensatoria.

El hecho de que la obesidad induzca la expresión uterina del $\beta 2$ AR pero no disminuya la actividad contráctil espontánea de ese tejido, sino por el contrario, la aumente; sugiere que la obesidad estaría modificando otros factores que controlan la peristalsis uterina en este estadio. Motivados, entonces, por estudiar otros mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la actividad contráctil uterina que pudiera explicar dicha contradicción, se evaluó la expresión uterina de PPAR γ , factor de transcripción involucrado en el mantenimiento de la quiescencia uterina que regula, además, el proceso implantatorio (Vitti *et al.* 2016; Rizzo *et al.* 2009; Froment *et al.* 2006; Dunn-Albanese *et al.* 2004). Aquí describimos que la obesidad *down-regula* la expresión uterina de PPAR γ en 4.5 gd. En relación a ello, se ha demostrado que la activación de PPAR γ suprime la síntesis de *nov* de la ciclooxigenasa 2 (COX-2), enzima limitante de la síntesis de prostaglandinas (Subbaramaiah *et al.* 2001; Szczepańska *et al.* 2018; Simonin *et al.* 2002). Las prostaglandinas cumplen un rol vital en el mantenimiento del tono contráctil miometrial e inhibidores de COX2, como la indometacina y celecoxib resultan ser

agentes tocolíticos (Reinebrant *et al.* 2015). Además, se ha descrito que la obesidad e insulino resistencia, ambas características presentes en nuestro animales, se asocia con un aumento de COX-2 en diferentes tejidos (Sookvanichsilp y Pulbutr 2002; Muñoz *et al.* 2015). Estas evidencias permiten sugerir que la obesidad al inhibir la expresión uterina de PPAR γ estimularía la síntesis de COX-2, lo que produciría un desbalance en la síntesis uterina de prostaglandinas. Pudiendo esto último explicar el aumento de la actividad contráctil uterina detectada en los animales obesos en 4.5 gd.

Además de todo lo expuesto, los resultados del análisis de la actividad uterina contráctil en 4.5 gd en respuesta a Salbutamol permite concluir, además, que los úteros de ratas obesas tienen la capacidad de activar la vía de señalización desencadenada por β 2 AR. El hecho de que espontáneamente esto no ocurra en condiciones de obesidad podría deberse a que ésta genere una disminución niveles del ligando endógeno del β 2 AR; así dicha vía de señalización no se vería activa y consecuentemente no se induciría la relajación miometrial.

Lo que si resulta claro y se demuestra aquí, por primera vez, es que la obesidad altera la peristalsis uterina durante el periodo de pre-implantación embrionaria, evidenciada aquí por el aumento en la actividad contráctil uterina espontánea en 4.5 gd. Esta alteración podría explicar el retraso en el descenso de los embriones del oviducto al lumen uterino detectado en las ratas obesas, como así también del espaciamiento embrionario anómalo detectado en estos animales.

Todos los hallazgos hasta aquí discutidos condujeron a preguntarnos si la actividad contráctil uterina se vería alterada desde etapas previas a la concepción. Aquí se describe que la obesidad no modifica la expresión génica uterina del LPA $_3$ pero produce una *down*-regulación sobre la expresión del β 2AR, tanto a nivel génico como proteico, sin alterar su localización, antes de que ocurra la concepción. Así, aquí se demuestra que la obesidad presenta un efecto diferencial sobre la expresión uterina del β 2 AR y el Lpa $_3$ dependiendo del estadio reproductivo en que el animal se encuentra (pre-concepción o pre-implantación).

En pre-gestación, la actividad contráctil espontánea uterina no se ve modificada como consecuencia de la obesidad. Sin embargo, ésta disminuye la sensibilidad uterina a Salbutamol, probablemente como consecuencia de la disminución en los niveles uterinos de β 2AR. Esta menor sensibilidad del útero obeso frente a un estímulo de relajación no es un hecho menor, dado que para que la implantación ocurra correctamente el útero debe permanecer en estadio quiescente, requisito indispensable previo a la nidación y la invasión decidual (Bulletti y Ziegler 2006). Así, la alteración en la quiescencia uterina detectada en los animales obesos pre-gestantes, podría ser un marcador temprano de posibles problemas implantatorios, que ocurrirían si se produjera la concepción en estos animales. En relación a ello, tanto estudios

realizados en animales como investigaciones clínicas indican que cuando la implantación embrionaria en condiciones no óptimas, debido a alteraciones en el momento o en el sitio donde se lleva a cabo, se producen efectos adversos sobre el desarrollo de la gestación (Chen *et al.* 2013; Song *et al.* 2002; Wang y Dey 2006). La contractilidad uterina inadecuada puede conducir a embarazos ectópicos, abortos espontáneos, sangrado retrógrado con dismenorrea y endometriosis (Bulletti y Ziegler 2006; Chen *et al.* 2013). En este sentido, se ha reportado que una mayor actividad contráctil uterina se asocia a una menor tasa de embarazo tanto en reproducción espontánea como asistida (Fanchin *et al.* 1998). En concordancia con estos hallazgos, en este trabajo se describe por primera vez que la obesidad genera una disminución de las tasas de fertilidad y un aumento de la actividad contráctil uterina durante la etapa de pre-implantación embrionaria.

En este punto cabe resaltar la importancia de la utilización del modelo murino de obesidad que permitió no solo estudiar el efecto de la obesidad en etapas pre-implantatorias (imposible de realizar en humanos); sino que, además, permitió evidenciar alteraciones en la distribución intrauterina de los embriones, fenómeno difícil de ser evaluado en especies con un único sitio de implantación. Al respecto, cabe mencionar que aunque el fenómeno de la distribución embrionaria a lo largo de los cuernos uterinos es exclusivo de especies con múltiples sitios de implantación, los factores que controlan la localización de los embriones en el útero materno son conservados especies uníparas, tales como los humanos, en los cuales el sitio de implantación del embrión está restringido al *fundus* uterino (Bulletti y Ziegler 2006).

La implantación embrionaria puede verse afectada o impedida, aun cuando el estado uterino es óptimo, debido a que este proceso es el resultado de una correcta comunicación entre el útero materno y el embrión (Stamenov y Parvanov 2018; Armant 2005). Este diálogo debe estar perfectamente sincronizado en un rango de tiempo específico llamado "ventana de implantación" (Stamenov y Parvanov 2018).

Aquí describimos que la obesidad materna genera un desfase en el desarrollo embrionario concomitantemente con un retraso en el ingreso de los embriones al útero materno. Pese a ello, el número total de implantaciones evaluadas en estadios gestacionales más tardíos no se vio alterada como consecuencia de la obesidad. Esto nos lleva a pensar que, al menos alguno de los embriones detectados en los oviductos en 4.5 gd logra implantarse más tardíamente. Así, la obesidad genera, entonces, un desfase de la ventana de implantación que resulta sincronía con el desarrollo embrionario en estos animales, permitiendo que la implantación ocurra más tardíamente que en animales control. Esto no es un hecho menor, dado que podría explicar las bajas tasas de implantación observadas en la clínica con pacientes obesas (Bellver *et al.* 2007, 2013, 2015); es por ello que resulta de vital importancia poder

establecer como se modifica la ventana implantatoria en condiciones de obesidad. Esto permitiría determinar el momento más indicado para realiza las transferencias embrionarias a pacientes obesas; incrementándose consecuentemente las tasas de implantación.

El presente trabajo demuestra que la obesidad altera la peristalsis uterina en etapas previas a la implantación embrionaria; y se propone a éste como, al menos uno de los mecanismos responsables de las alteraciones en el transporte útero-tubárico de los embriones y del posicionamiento embrionario intrauterino. Si bien se requieren estudios adicionales para confirmar la acción directa del aumento de la actividad contráctil uterina durante el periodo de pre-implantación y fallas en el proceso de implantación, de confirmarse esto, las implicaciones clínicas podrían ser importantes. En eso caso podría, por ejemplo, evaluarse la administración tópica de agentes farmacológicos que inhiben las contracciones uterinas como un posible régimen terapéutico en mujeres obesas con pérdida recurrente de embarazo o infertilidad, problemas comunes y crecientes en la actualidad.

De esta forma, con el presente trabajo, se contribuyó en la comprensión de los principales mecanismos reguladores del ambiente uterino y del posicionamiento embrionario intrauterino; evaluando, además, como se ven afectados por la obesidad materna pre-concepcional. Permitiendo de esta manera comprender algunos de los mecanismos que regulan la fisiología uterina, favoreciendo potencialmente el desarrollo de un tratamiento, en lo que a medicina reproductiva se refiere, que permita preservar la fertilidad en las mujeres obesas.

Conclusión

En el presente trabajo se demuestra que la dieta CAF administrada a ratas Wistar hembras durante 60 días induce hiperfagia voluntaria y el consecuente desarrollo de obesidad. Además, observamos que la obesidad genera alteraciones a nivel metabólico, uterino, reproductivo y gestacional:

La obesidad inducida por CAF genera a nivel metabólico:

- ✓ *Hiperglucemia*
- ✓ *Intolerancia a glucosa*
- ✓ *Resistencia a insulina*

La obesidad inducida por CAF genera a nivel uterino:

- ✓ *Resistencia local a insulina*
- ✓ *Disminución de la expresión de InsR*
- ✓ *Aumento de la expresión de Hif1 α*
- ✓ *Aumento de la proliferación uterina*
- ✓ *Disminución de la expresión génica y proteica de β 2AR*
- ✓ *No modifica la actividad contráctil uterina espontánea; sin embargo, disminuye la sensibilidad a salbutamol*

La obesidad inducida por CAF genera:

- ✓ *Disminución de las tasas de fertilidad*
- ✓ *Aumento del tiempo de concepción*

La obesidad materna pre-concepcional genera:

En pre-implantación (4.5 gd):

- ✓ *Disparidad en el número de embriones presentes en ambos cuernos uterinos*
- ✓ *Retraso en el descenso de los embriones a la cavidad uterina*
- ✓ *Desfasaje en el desarrollo embrionario*
- ✓ *Aumento de embriones no viables*
- ✓ *Aumento en los niveles génicos y proteicos de β 2AR en el útero*

- ✓ *Aumento en la actividad contráctil uterina espontánea y una mayor sensibilidad uterina a salbutamol*
- ✓ *Disminución uterina de la expresión de Lpa_3*
- ✓ *Disminución uterina de la expresión de PPAR γ*

En post-implantación temprana (5.5 gd):

- ✓ *Disparidad en el número de SI presentes en ambos cuernos uterinos*
- ✓ *Alteración el espaciamiento embrionario*

En gestación tardía (18.5 gd):

- ✓ *Disparidad en el número de fetos presentes en ambos cuernos uterinos*
- ✓ *Aumento en los niveles séricos de Estradiol*
- ✓ *Macrosomía fetal*

Todos estos resultados apoyan nuestra hipótesis de que la obesidad genera en la funcionalidad uterina, modificándose el ambiente intrauterino, afectando, consecuentemente, el desarrollo embrionario y fetal.

Concluimos por tanto, que la obesidad actúa sobre el útero de la rata desde antes de la concepción. Su efecto se extiende a la gestación, sin embargo su efecto es diferencial dependiendo el estadio reproductivo en el que la misma se encuentre. Como consecuencia de todas las alteraciones ya discutidas, demostramos que la obesidad materna adquirida antes de la concepción es requisito suficiente para generar macrosomía fetal, aun cuando la madre se alimente normalmente durante la gestación.

Todas estas evidencias resaltan la importancia del peso materno al momento de la concepción y refuerzan la necesidad de estudiar de qué manera la obesidad materna afecta el ambiente uterino a fines de proponer tratamientos que permitan prevenir/revertir dichas alteraciones en pos de mejorar no sólo la salud reproductiva materna sino también la de las futuras generaciones.

Bibliografía

Adamson S, Yong LL, Whiteley KJ, Holmyard D, Hemberger M, Pfarrer C y Cross JC. 2002. "Interactions between Trophoblast Cells and the Maternal and Fetal Circulation in the Mouse Placenta." *Developmental Biology* 250 (2): 358–73. <https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0773>.

Aguilar HN y Mitchell BF. 2010. "Physiological Pathways and Molecular Mechanisms Regulating Uterine Contractility." *Human Reproduction Update* 16 (6): 725–44. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmq016>.

Aplin JD. 2000. "The Cell Biological Basis of Human Implantation." *Bailliere's Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology* 14 (5): 757–64. <https://doi.org/10.1053/beog.2000.0116>.

Allen E. 1922. "The Oestrous Cycle in the Mouse." *American Journal of Anatomy*. <https://doi.org/10.1002/aja.1000300303>

Anoop M y Lokesh K. 2008. "Obesity and the Metabolic Syndrome in Developing Countries." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 93 (11 SUPPL. 1): s9–30. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-1595>.

Antonioti GS, Coughlan M, Salamonsen LA y Evans J. 2018. "Obesity Associated Advanced Glycation End Products within the Human Uterine Cavity Adversely Impact Endometrial Function and Embryo Implantation Competence." *Human Reproduction*, no. February: 1–12. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey029>.

Araujo EJ, Borges Peixoto A, Perez Zamarian AC, Elito JJ y Tonni G. 2017. "Macrosomia." *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 38: 83–96. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2016.08.003>.

Aricha-Tamir B, Weintraub AY, Levi I y Sheiner E. 2012. "Downsizing Pregnancy Complications: A Study of Paired Pregnancy Outcomes before and after Bariatric Surgery." *Surgery for Obesity and Related Diseases : Official Journal of the American Society for Bariatric Surgery* 8 (4): 434–39. <https://doi.org/10.1016/j.soard.2011.12.009>.

Armant DR. 2005. "Blastocysts Don't Go It Alone. Extrinsic Signals Fine-Tune the Intrinsic Developmental Program of Trophoblast Cells." *Dev Biol* 280 (2): 260–80. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.02.009>.

Armoni M, Harel C y Karnieli E. 2007. "Transcriptional Regulation of the GLUT4 Gene: From PPAR-Gamma and FOXO1 to FFA and Inflammation." *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 18 (3): 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2007.02.001>.

Athukorala C, Rumbold AR, Kristyn JW y Crowther C A. 2010. "The Risk of Adverse Pregnancy Outcomes in Women Who Are Overweight or Obese." *BMC Pregnancy and Childbirth* 10 (September): 56. <https://doi.org/10.1186/1471-2393-10-56>.

Akyol A, Langley-Evans SC. y McMullen S. 2009. "Obesity Induced by Cafeteria Feeding and Pregnancy Outcome in the Rat." *British Journal of Nutrition* 102 (11): 1601–10. <https://doi.org/10.1017/S0007114509990961>.

Baerwald AR, Adams GP y Pierson RA. 2012. "Ovarian Antral Folliculogenesis during the Human Menstrual Cycle: A Review." *Human Reproduction Update* 18 (1): 73–91. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmr039>.

Barnet SA. 2007. "The Rat: A Study in Behavior." *The Rat: A Study in Behavior*. 2007. <http://hdl.handle.net/1885/115026>

Bartol FF, Wiley AA, Spencer TE, Vallet JL y Christenson RK. 1993. "Early Uterine Development in Pigs." *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement* 48: 99–116. PMID: 8145217

Bartol FF, Wiley AA, Floyd JG, Ott TL, Bazer FW, Gray CA, y Spencer TE. 1999. "Uterine Differentiation as a Foundation for Subsequent Fertility." *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement* 54: 287–302. PMID: 10692862

Bazer FW, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC y Wu G. 2009. "Comparative Aspects of Implantation." *Reproduction (Cambridge, England)* 138 (2): 195–209. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0158>.

Barnes FL. 2000. "The Effects of the Early Uterine Environment on the Subsequent Development of Embryo and Fetus." *Theriogenology* 53 (2): 649–58. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00264-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00264-2).

Bygdeman M, Bremme K, Gillespie A, Lundström V. "Effects of the prostaglandins on the uterus. Prostaglandins and uterine contractility". 1979. *Acta Obstet Gynecol Scand* . Suppl. 1979;87:33-8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/288294>

Bazzano MV, Torelli C, Pustovrh MC, Paz DA y Elia EM. 2015. "Obesity Induced by Cafeteria Diet Disrupts Fertility in the Rat by Affecting Multiple Ovarian Targets." *Reproductive Biomedicine Online* 31 (5): 655–67. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.08.004>.

Bazzano MV, Paz DA y Elia EM. 2017. "Obesity Alters the Ovarian Glucidic Homeostasis Disrupting the Reproductive Outcome of Female Rats." *Journal of Nutritional Biochemistry* 42: 194–202. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.01.003>.

Bazzano, MV, Sarrible GB, Martinez N, Berón de Astrada M y Elia EM. 2018. "Obesity Alters the Uterine Environment before Pregnancy." *The Journal of Nutritional Biochemistry* 62: 181–91. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.09.009>.

Bellver J, Rossal LP., Bosch E, Zúñiga A, Corona JT., Meléndez Fernando, Gómez Emilio, Simón Carlos, Remohí J y Pellicer A. 2003. "Obesity and the Risk of Spontaneous Abortion after Oocyte Donation." *Fertility and Sterility* 79 (5): 1136–40. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(03\)00176-6](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(03)00176-6).

Bellver J, Melo Marco AB, Bosch E, Serra V, Remohi J y Pellicer A. 2007. "Obesity and Poor Reproductive Outcome: The Potential Role of the Endometrium." *Fertility and Sterility* 88 (2): 446–51. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.11.162>.

Bellver J, Martinez-Conejero JA, Labarta E, Alama P, Barreto Melo MA, Remohi J, Pellicer A y Horcajadas JA. 2011. "Endometrial Gene Expression in the Window of Implantation Is Altered in Obese Women Especially in Association with Polycystic Ovary Syndrome." *Fertility and Sterility* 95 (7): 2335–41, 2341.e1-8. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.03.021>.

Bellver J, Pellicer A, Garcia-Velasco JA, Ballesteros A, Remohi J y Meseguer M. 2013. "Obesity Reduces Uterine Receptivity: Clinical Experience from 9,587 First Cycles of Ovum Donation with Normal Weight Donors." *Fertility and Sterility* 100 (4): 1050–58. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.06.001>.

Bellver J, De Los Santos MJ, Alama P, Castello D, Privitera L, Galliano D, Labarta E, Vidal C, Pellicer A y Dominguez F. 2015. "Day-3 Embryo Metabolomics in the Spent Culture Media Is Altered in Obese Women Undergoing in Vitro Fertilization." *Fertility and Sterility* 103 (6): 1407–15.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.03.015>.

Bertolin K y Bruce MD. 2014. "Reproductive Tract Changes During the Mouse Estrous Cycle." In *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*, 87.

Blaak EE, van Baak MA, Kempen KP y Saris W H. 1993. "Role of Alpha- and Beta-Adrenoceptors in Sympathetically Mediated Thermogenesis." *The American Journal of Physiology* 264 (1 Pt 1): E11-7. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1993.264.1.E11>.

Boden G. 1997. "Perspectives in Diabetes Role of Fatty Acids in the Pathogenesis of Insulin Resistance and NIDDM." *Diabetes* 46. <https://doi.org/10.2337/diab.46.1.3>.

Bottari SP, Vokaer A, Kaivez E, Lescrainier JP y Vauquelin GP. "Differential regulation of alpha-adrenergic receptor subclasses by gonadal steroids in human myometrium". 1983. *J Clin Endocrinol Metab.* 57(5):937-41. DOI: 10.1210/jcem-57-5-937

Bray GA y York DA. 1979. "Hypothalamic and Genetic Obesity in Experimental Animals: An Autonomic and Endocrine Hypothesis." *Physiological Reviews* 59 (3): 719–809. <https://doi.org/10.1152/physrev.1979.59.3.719>.

Breckenkamp J, Razum O, Henrich W, Borde T y David M. 2019. "Effects of Maternal Obesity, Excessive Gestational Weight Gain and Fetal Macrosomia on the Frequency of Cesarean Deliveries among Migrant and Non-Migrant Women - a Prospective Study." *Journal of Perinatal Medicine*, February. <https://doi.org/10.1515/jpm-2018-0399>.

Brewer CJ. y Balen AH.. 2010. "The Adverse Effects of Obesity on Conception and Implantation." *Reproduction* 140 (3): 347–64. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0568>.

Brown A, Hossain I, Perez LJ, Nzirorera C, Tozer K1, D'Souza K, Trivedi PC, Aguiar C, Yip AM, Shea J3, Brunt KR, Legare JF, Hassan A, Pulinilkunnil T y Kienesberger PC. 2017. "Lysophosphatidic Acid Receptor mRNA Levels in Heart and White Adipose Tissue Are Associated with Obesity in Mice and Humans." *PLOS ONE*, 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189402>.

Bryant NJ, Govers R y James DE. 2002. "Regulated Transport of the Glucose Transporter GLUT4." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 3 (4): 267–77. <https://doi.org/10.1038/nrm782>.

Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart LA, Schölmerich J y Bollheimer LC. 2006. "Defining High-Fat-Diet Rat Models: Metabolic and Molecular Effects of Different Fat Types." *Journal of Molecular Endocrinology* 36 (3): 485–501. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01909>.

Bulletti C y de Ziegler D. 2006. "Uterine Contractility and Embryo Implantation." *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology* 18 (4): 473–84. <https://doi.org/10.1097/01.gco.0000233947.97543.c4>.

Burnstock G y Prosser CL. 1960. "Responses of Smooth Muscles to Quick Stretch: Relation of Stretch to Conduction." *The American Journal of Physiology* 198 (May): 921–25. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1960.198.5.921>.

Campbell JM., Lane M., Owens JA y. Bakos HW. 2015. "Paternal Obesity Negatively Affects Male Fertility and Assisted Reproduction Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Reproductive BioMedicine Online* 31 (5): 593–604. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.07.012>.

Carsten ME, MillerJD (Eds.). 1990. Uterine Function. Molecular and Cellular Aspects.

Cavagna M y Mantese JC. 2003. "Biomarkers of Endometrial Receptivity--a Review." *Placenta* 24 Suppl B (October): S39-47. [https://doi.org/10.1016/S0143-4004\(03\)00184-X](https://doi.org/10.1016/S0143-4004(03)00184-X).

Cedergren MI y Kallen BA. 2003. "Maternal Obesity and Infant Heart Defects." *Obesity Research* 11 (9): 1065–71. <https://doi.org/10.1038/oby.2003.146>.

Chavez-Genaro R, Lombide P y Anesetti G. 2006. "A Quantitative Study of Rat Uterine Sympathetic Innervation during Pregnancy and Post Partum." *Reproduction, Fertility, and Development* 18 (5): 525–31. <https://doi.org/10.1071/RD05053>.

Chan M. World Health Organization. 2016. "Obesity and Diabetes: The Slow-Motion Disaster Keynote Address at the 47th Meeting of the National Academy of Medicine." <https://www.who.int/dg/speeches/2016/obesity-diabetes-disaster/en/>

Chason RJ, Csokmay J, Segars JH, Decherney AH y Randall A. 2012. "Environmental and Epigenetic Effects upon Preimplantation Embryo Metabolism and Development." *Trends Endocrinol Metab* 22 (10): 412–20. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2011.05.005>.Environmental.

Chaud MA., Franchi AM., Beron De Astrada M.y Gimeno MF.. 1997. "Role of Nitric Oxide on Oxytocin-Evoked Contractions and Prostaglandin Synthesis in Isolated Pregnant Rat Uterus." *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 57 (3): 323–29. [https://doi.org/10.1016/S0952-3278\(97\)90551-2](https://doi.org/10.1016/S0952-3278(97)90551-2).

Chen Q, Zhang Y, Elad D, Jaffa AJ., Cao Y, Ye X y Duan E. 2013. "Navigating the Site for Embryo Implantation: Biomechanical and Molecular Regulation of Intrauterine Embryo Distribution." *Molecular Aspects of Medicine* 34 (5): 1024–42. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.017>.

Chen Q, Zhang Y, Peng H, Lei L, Kuang H, Zhang L, Ning L, Cao Y y Duan E. 2011. "Transient B2-Adrenoceptor Activation Confers Pregnancy Loss by Disrupting Embryo Spacing at Implantation." *Journal of Biological Chemistry* 286 (6): 4349–56. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.197202>.

Clegg DJ, Benoit SC, Reed JA, Woods SC, Dunn-Meynell A y Levin BE. "Reduced anorexic effects of insulin in obesity-prone rats fed a moderate-fat diet". 2005. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 288(4):R981-6. DOI: 10.1152/ajpregu.00675.2004

Coatmellec-Taglioni G, Dausse JP, Ribiere C y Giudicelli Y. 2000. "Hypertension in Cafeteria-Fed Rats: Alterations in Renal Alpha2-Adrenoceptor Subtypes." *American Journal of Hypertension* 13 (5 Pt 1): 529–34. [https://doi.org/10.1016/s0895-7061\(99\)00234-4](https://doi.org/10.1016/s0895-7061(99)00234-4).

Cooke PS, Spencer TE, Bartol FF y Hayashi K. "Uterine glands: development, function and experimental model systems". 2013. *Mol Hum Reprod.* 19(9):547-58. Doi: 10.1093/molehr/gat031.

Correia-da-Silva G, Bell SC, Pringle JH, Teixeira NA. "Patterns of uterine cellular proliferation and apoptosis in the implantation site of the rat during pregnancy". 2004. *Placenta.* 25(6):538-47. DOI: 10.1016/j.placenta.2003.11.007

Courties A, Sellam J y Berenbaum F. 2017. "Metabolic Syndrome-Associated Osteoarthritis." *Current Opinion in Rheumatology* 29 (2): 214–22. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000373>.

Maybin JA, Murray AA, Saunders Philippa TK, Hirani Nikhil y Carmelietet P y Critchley H . 2018. "Hypoxia and Hypoxia Inducible Factor-1 α Are Required for Normal Endometrial Repair during Menstruation." *Nature Communications.* <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02375-6>.

Cross JC. 2005. "How to Make a Placenta: Mechanisms of Trophoblast Cell Differentiation in Mice--a Review." *Placenta* 26 Suppl A (April): S3-9. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2005.01.015>.

Croxatto HB. 2002. "Physiology of Gamete and Embryo Transport through the Fallopian Tube." *Reproductive Biomedicine Online* 4 (2): 160–69. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61935-9](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61935-9).

Dağ ZÖ y Dilbaz B. 2015. "Impact of Obesity on Infertility in Women." *Journal of the Turkish German Gynecology Association* 16 (2): 111–17. <https://doi.org/10.5152/jtgga.2015.15232>.

Dalamaga M. 2013. "Obesity, Insulin Resistance, Adipocytokines and Breast Cancer: New Biomarkers and Attractive Therapeutic Targets." *World Journal of Experimental Medicine* 3 (3): 0. <https://doi.org/10.5493/wjem.v3.i3.34>.

Dalmas E, Venteclef N, Caer C, Poitou C, Cremer I, Aron-Wisnewsky J, Lacroix-Desmazes S *et al.* 2014. "T Cell-Derived IL-22 Amplifies IL-1 β -Driven Inflammation in Human Adipose Tissue: Relevance to Obesity and Type 2 Diabetes." *Diabetes* 63 (6): 1966–77. <https://doi.org/10.2337/db13-1511>.

DeFronzo RA. 1999. "Pharmacologic Therapy for Type 2 Diabetes Mellitus." *Annals of Internal Medicine* 131 (4): 281–303. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-131-4-199908170-00008>.

Demir R, Kayisli UA, Celik-Ozenci C, Korgun ET, Demir-Weusten AY y Arici A. 2002. "Structural Differentiation of Human Uterine Luminal and Glandular Epithelium during Early Pregnancy: An Ultrastructural and Immunohistochemical Study." *Placenta* 23 (8–9): 672–84. <https://doi.org/10.1053/plac.2002.0841>.

Dessolle L, Darai E, Cornet D, Rouzier R, Coutant C, Mandelbaum J y Antoine JM. 2009. "Determinants of Pregnancy Rate in the Donor Oocyte Model: A Multivariate Analysis of 450 Frozen-Thawed Embryo Transfers." *Human Reproduction (Oxford, England)* 24 (12): 3082–89. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep303>.

DeUgarte DA, DeUgarte CM y Sahakian V. 2010. "Surrogate Obesity Negatively Impacts Pregnancy Rates in Third-Party Reproduction." *Fertility and Sterility* 93 (3): 1008–10. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.07.1005>.

Devaux M y Sassi F. 2015. "The Labour Market Impacts of Obesity, Smoking, Alcohol Use and Related Chronic Diseases." *OECD Health Working Papers*, no. 86: 0–50. <https://doi.org/10.1787/5jrqn5fpv0v-en>.

Dokras A, Baredziak L, Blaine J, Syrop C, VanVoorhis BJ y Sparks A. 2006. "Obstetric Outcomes after in Vitro Fertilization in Obese and Morbidly Obese Women." *Obstetrics and Gynecology* 108 (1): 61–69. <https://doi.org/10.1097/01.AOG.0000219768.08249.b6>.

Dunn-albanese LR, Ackerman WE, Xie Y, Lams JD y Kniss DA. 2004. "Reciprocal Expression of Peroxisome Proliferator- Activated Receptor- γ and Cyclooxygenase-2 in Human Term Parturition." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 190 (190): 809–16. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2003.09.052>.

Edson MA, Ankur KN y Matzuk MM. 2009. "The Mammalian Ovary from Genesis to Revelation." *Endocrine Reviews* 30 (6): 624–712. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0012>.

Edwards RG. 1995. "Clinical Approaches to Increasing Uterine Receptivity during Human Implantation." *Human Reproduction (Oxford, England)* 10 Suppl 2 (December): 60–66. https://doi.org/10.1093/humrep/10.suppl_2.60.

Egarter CH y Husslein P. 1992. "Biochemistry of Myometrial Contractility." *Bailliere's Clinical Obstetrics and Gynaecology* 6 (4): 755–69. PMID: 1335853

Ehrenberg HM, Mercer BM y Catalano PM. 2004. "The Influence of Obesity and Diabetes on the Prevalence of Macrosomia." *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 964–68. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2004.05.052>.

Elia EM., Pustovrh C, Amalfi S, Devoto L y Motta AB. 2011. "Link between Metformin and the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Pathway in the Uterine Tissue of Hyperandrogenized Prepubertal Mice." *Fertility and Sterility* 95 (8): 2534–2537.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.02.004>.

Elia EM, Bazzano MV, Quintana R y Paz DA. "Reproductive disorders in obesity" Review Article. *Integrative Obesity and Diabetes*. <https://www.oatext.com/pdf/IOD-1-105.pdf>

Enders AC y Schlafke S. 1967. "A Morphological Analysis of the Early Implantation Stages in the Rat." *Anatomy* 120: 185–226. <https://doi.org/https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/aja.1001200202>.

Engstrom T, Vilhardt H, Bratholm P y Christensen NJ. 2001. "Desensitization of Beta2-Adrenoceptor Function in Non-Pregnant Rat Myometrium Is Modulated by Sex Steroids." *The Journal of Endocrinology* 170 (1): 147–55.

Tamer EC y Senturk LM. 2009. "The Impact of Body Mass Index on Assisted Reproduction." *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 21 (4): 228–35. <https://doi.org/10.1016/j.kontakt.2016.10.003>.

Ewing R, Schmid T, Killingsworth R, Zlot A y Raudenbush S. 2008. "Relationship Between Urban Sprawl and Physical Activity, Obesity, and Morbidity." In *Urban Ecology: An International Perspective on the Interaction Between Humans and Nature*, edited by John M Marzluff, Eric Shulenberger, Wilfried Endlicher, Marina Alberti, Gordon Bradley, Clare Ryan, Ute Simon, and Craig ZumBrunnen, 567–82. Boston, MA: Springer US. <https://doi.org/10.4278/0890-1171-18.1.47>

Fanchin R, Ayoubi JM. 2009. "Uterine Dynamics: Impact on the Human Reproduction Process." *Reproductive Biomedicine Online* 18 Suppl 2: 57–62. [https://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483\(10\)60450-6/pdf](https://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483(10)60450-6/pdf)

Fanchin R, Righini C, Olivennes F, Taylor S, de Ziegler D y Frydman R. 1998. "Uterine Contractions at the Time of Embryo Transfer Alter Pregnancy Rates after In-Vitro Fertilization." *Human Reproduction* (Oxford, England) 13 (7): 1968–74.

Fanchin R, Ayoubi JM, Olivennes F, Righini C, de Ziegler D, Frydman R. 2000. "Hormonal Influence on the Uterine Contractility during Ovarian Stimulation." *Human Reproduction* (Oxford, England) 15 Suppl 1 (June): 90–100. https://doi.org/10.1093/humrep/15.suppl_1.90.

Fedorcsák P, Dale PO, Storeng R, Ertzeid G, Bjercke S, Oldereid N, Omland AK, Abyholm T y Tanbo T. 2004. "Impact of Overweight and Underweight on Assisted Reproduction Treatment." *Human Reproduction* (Oxford, England) 19 (11): 2523–28. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh485>.

Felson DT, Anderson JJ, Naimark A, Walker AM y Meenan RF . 1988. "Obesity and Knee Osteoarthritis: The Framingham Study." *Annals of Internal Medicine* 109 (July 1988): 18–24. <https://doi.org/10.1059/0003-4819-109-1-18>.

Fernandes de Melo A, Campos Lima MC, Ferreira Sales C, Chaves Ernest V, Rentz T, Fonseca Raposo H, Rissato Garofalo MA, Botion LM, Kettelhut I y Franco de Oliveira HC 2018. "Biochimie Increase in Liver Cytosolic Lipases Activities and VLDL-TAG Secretion Rate Do Not Prevent the Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Cafeteria Diet-Fed Rats." *Biochimie* 150: 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.04.021>.

Ferrazzi E, Brembilla G, Cipriani S, Livio S, Paganelli A y Parazzini F. 2019. "European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology Maternal Age and Body Mass Index at Term : Risk Factors for Requiring an Induced Labour for a Late-Term Pregnancy." *European Journal of Obstetrics and Gynecology* 233: 151–57. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2018.12.018>.

Ferry B, Roozendaal B y McGaugh JL. 1999. "Role of Norepinephrine in Mediating Stress Hormone Regulation of Long-Term Memory Storage: A Critical Involvement of the Amygdala." *Biological Psychiatry* 46 (9): 1140–52. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(99\)00157-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(99)00157-2)

Figuroa-garcía MC, Rivera-valencia M, Sosa-durán EE, Saavedra-molina FA y Mejía-zepeda R. 2016. "Perfil Glicémico Durante El Ayuno En Ratas Macho-Wistar Con Diabetes Tipo 2." *Metabolismo* 83 (1 y 2): 23–30. <http://www.medigraphic.com/pdfs/juarez/ju-2016/ju161-2e.pdf>

Flier JS. 2004. "Obesity Wars: Molecular Progress Confronts an Expanding Epidemic." *Cell* 116 (2): 337–50. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)01081-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01081-X).

Fonseca BM, Correia-da-Silva G y Natercia AT. 2012. "The Rat as an Animal Model for Fetoplacental Development: A Reappraisal of the Post-Implantation Period." *Reproductive Biology* 12 (2): 97–118. [https://doi.org/10.1016/S1642-431X\(12\)60080-1](https://doi.org/10.1016/S1642-431X(12)60080-1).

Froment P, Gizard F, Defever D, Staels B, Dupont J y Monget P. 2006. "Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Reproductive Tissues: From Gametogenesis to Parturition." *The Journal of Endocrinology* 189 (2): 199–209. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06667>.

Fox, SI. 2008. *Fisiología Humana*. Capítulo 20. Ed: 14. Mcgraw-hill interamericana.

Franzosi MG. 2006. "Should We Continue to Use BMI as a Cardiovascular Risk Factor?" *Lancet (London, England)* 368 (9536): 624–25. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69222-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69222-2).

Frederick CB, Snellman K y Putnam RD. 2013. "Increasing Socioeconomic Disparities in Adolescent Obesity." *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, 1–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321355110>.

Frolova AI y Moley KH 2011a. "Glucose Transporters in the Uterus: An Analysis of Tissue Distribution and Proposed Physiological Roles." *Reproduction* 142 (2): 211–20. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0114>.

Frolova AI y Moley KH 2011b. "Quantitative Analysis of Glucose Transporter MRNAs in Endometrial Stromal Cells Reveals Critical Role of GLUT1 in Uterine Receptivity." *Endocrinology* 152 (5): 2123–28. <https://doi.org/10.1210/en.2010-1266>.

Furukawa S, Naho T y Sugiyama A. 2019. "Morphology and Physiology of Rat Placenta for Toxicological Evaluation." *Journal of Toxicologic Pathology* 32 (1): 1–17. <https://doi.org/10.1293/tox.2018-0042>.

Gallagher EJ y LeRoith D. 2015. "Obesity and Diabetes: The Increased Risk of Cancer and Cancer-Related Mortality." *Physiological Reviews* 95 (3): 727–48. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2014>.

Giviziez CR, Sanchez EG, Approbato MS, Maia MC, Fleury EA y Sasak RS 2016. "Review Article Obesity and Anovulatory Infertility : A Review." *JBRA Assisted Reproduction* 20 (4): 240–45. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20160046>.

Görgens SW, Benninghoff T, Eckardt K, Springer C, Chadt A, Melior A, Wefers J, Cramer A, Jensen J, Birkeland KI, Drevon CA, Al-Hasani H, Eckel J. 2017. "Hypoxia in Combination With Muscle Contraction Improves Insulin Action and Glucose Metabolism in Human Skeletal Muscle via the HIF-1 α Pathway." *Diabetes* 66 (11): 2800–2807. <https://doi.org/10.2337/db16-1488>.

Graves E, Hill DJ, Evers S, Van Aarsen K, Yama B, Yuan S y Campbell MK. 2015. "The Impact of Abnormal Glucose Tolerance and Obesity on Fetal Growth." *Journal of Diabetes Research* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/847674>.

Grundy SM. 2004. "Obesity, Metabolic Syndrome, and Cardiovascular Disease" *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89 (6): 2595–2600. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0372>.

Gunin AG, Mashin IN y Zakharow DA. 2001. "Proliferation, Mitosis Orientation and Morphogenetic Changes in the Uterus of Mice Following Chronic Treatment with Both Estrogen and Glucocorticoid Hormones." *Journal of Endocrinology* 169 (1): 23–31. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1690023>.

Hajagos-Tóth J, Ducza E, Samavati R, Vari SG, Gaspar R 2017. "Obesity in Pregnancy : A Novel Concept on the Roles of Adipokines in Uterine Contractility." *Croat Med* 58: 96–104. <https://doi.org/10.3325/cmj.2017.58.96>.

Halberg N, Khan T, Trujillo ME, Wernstedt-Asterholm I, Attie AD, Sherwani S, Wang ZV, Landskroner-Eiger S, Dineen S, Magalang UJ, Brekken RA y Scherer PE. 2009. "Hypoxia-Inducible Factor 1 α Induces Fibrosis and Insulin Resistance in White Adipose Tissue."

MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY 29 (16): 4467–83. <https://doi.org/10.1128/MCB.00192-09>.

Hama K, Aoki J, Inoue A, Endo T, Amano T, Motoki R, Kanai M, Ye X, Chun J, Matsuki N, Suzuki H, Shibasaki M y Arai H. 2007. “Embryo Spacing and Implantation Timing Are Differentially Regulated by LPA3-Mediated Lysophosphatidic Acid Signaling in Mice.” *Biology of Reproduction* 77: 954–59. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.060293>.

Hambly C, Adams A, Fustin JM, Rance KA, Bünger L y Speakman JR. 2005. “Mice with Low Metabolic Rates Are Not Susceptible to Weight Gain When Fed a High-Fat Diet.” *Obesity Research* 13 (3): 556–66. <https://doi.org/10.1038/oby.2005.59>.

Hartz AJ, Barboriak PN, Wong A, Katayama KP y Rimm AA. 1979. “The Association of Obesity with Infertility and Related Menstrual Abnormalities in Women.” *International Journal of Obesity* 3 (1): 57–73. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/528119>

Herberg L y Coleman DL. 1977. “Laboratory Animals Exhibiting Obesity and Diabetes Syndromes.” *Metabolism* 26 (1): 59–99. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(77\)90128-7](https://doi.org/10.1016/0026-0495(77)90128-7).

Hermann GM, Dallas LM, Haskell SE y Roghair RD. 2010. “Neonatal Macrosomia Is an Independent Risk Factor for Adult Metabolic Syndrome.” *Neonatology* 52242: 238–44. <https://doi.org/10.1159/000285629>.

Heyne A, Kiesselbach C, Sahún I, McDonald J, Gaiffi M y Dierssen M. 2009. “An Animal Model of Compulsive Food-Taking Behaviour.” *Addiction Biology* 14 (4): 373–83. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2009.00175.x>.

Hill JO, Wyatt HR y Peters JC. 2013. “Energy Balance and Obesity.” *Circulation* 126 (1): 126–32. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.087213.Energy>.

Holman GD. 2018. “Chemical Biology Probes of Mammalian GLUT Structure and Function.” *Biochem J*. 475 (22): 3511–34. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170677>.

Hruby A y Hu FB. 2016. “The Epidemiology of Obesity: A Big Picture.” *Pharmacoeconomics* 33 (7): 673–89. <https://doi.org/10.1007/s40273-014-0243-x.The>.

Hunter RH. 2012. “Components of Oviduct Physiology in Eutherian Mammals.” *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 87 (1): 244–55. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2011.00196.x>.

Hsieh CH, Wang TY, Hung CC, Chen MC y Hsu KC. 2015. “Improvement of Glycemic Control in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats by Atlantic Salmon Skin Gelatin Hydrolysate as the Dipeptidyl-Peptidase IV Inhibitor.” *Food & Function* 6 (6): 1887–92. <https://doi.org/10.1039/c5fo00124b>.

Ingalls AM, Dickie MM y Shell GD. 1950. “Obese, a New Mutation in the House Mouse.” *Journal of Heredity* 41: 317–18. <https://doi.org/10.1002/j.1550-8528.1996.tb00519.x>

Iyengar NM, Morris PG, Hudis CA y Dannenberg AJ. 2013. Obesity, Inflammation, and Breast Cancer. Obesity, Inflammation and Cancer. *Annual Reviews*. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012615-044359>

Johnson MH y McConnell JM. 2004. “Lineage Allocation and Cell Polarity during Mouse Embryogenesis.” *Seminars in Cell & Developmental Biology* 15 (5): 583–97. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2004.04.002>.

Johnson PM y Kenny. PJ. 2010. "Dopamine D2 Receptors in Addiction-like Reward Dysfunction and Compulsive Eating in Obese Rats." *Nature Neuroscience* 13 (5): 635–41. <https://doi.org/10.1038/nn.2519>.

Joost HG y Thorens B. 2001. "The Extended GLUT-Family of Sugar/Polyol Transport Facilitators: Nomenclature, Sequence Characteristics, and Potential Function of Its Novel Members (Review)." *Molecular Membrane Biology* 18 (4): 247–56. <https://doi.org/10.1080/09687680110090456>.

Jungheim ES, Schon SB, Schulte MB, DeUgarte DA, Fowler SA y Tuuli MG. 2013a. "IVF Outcomes in Obese Donor Oocyte Recipients: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Human Reproduction (Oxford, England)* 28 (10): 2720–27. <https://doi.org/10.1093/humrep/det292>.

Jungheim ES, Travieso JL y Hopeman MM. 2013b. "Weighing the Impact of Obesity on Female Reproductive Function and Fertility." *Nutrition Reviews* 71 (SUPPL1). <https://doi.org/10.1111/nure.12056>.

Kachur S, Lavie CJ, de Schutter A, Milani RV, Ventura HO. 2017. "Obesity and Cardiovascular Diseases." *Minerva Medica* 108 (3): 212–28. <https://doi.org/10.23736/S0026-4806.17.05022-4>.

Karizbodagh MP, Rashidi B, Sahebkar A, Masoudifar A, Mirzaei H. 2017. "Implantation Window and Angiogenesis." *Journal of Cellular Biochemistry* 118 (12): 4141–51. <https://doi.org/10.1002/jcb.26088>.

Kasum M, Orešković S, Čehić E, Lila A, Ejubović E, Soldo D. 2017. "The Role of Female Obesity on in Vitro Fertilization Outcomes." *Gynecological Endocrinology* 0 (0): 1–5. <https://doi.org/10.1080/09513590.2017.1391209>.

Kaufmann P. 1999. "The Anatomical Basis of Mouse Development." *Journal Anatomy*. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2000.197203313.x>.

Kelly T, Yang W, Chen CS, Reynolds K, He J. 2008. "Global Burden of Obesity in 2005 and Projections to 2030." *International Journal of Obesity (2005)* 32 (9): 1431–37. <https://doi.org/10.1038/ijo.2008.102>.

Kemmochi Y, Fukui K, Maki M, Kimura S, Ishii Y, Sasase T, Miyajima K y Ohta T. 2013. "Metabolic Disorders and Diabetic Complications in Spontaneously Diabetic Torii Lepr Rat: A New Obese Type 2 Diabetic Model." *Journal of Diabetes Research* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/948257>.

Kennedy TG y Lukash LA. 1982. "Induction of Decidualization in Rats by the Intrauterine Infusion of Prostaglandins." *Biology of Reproduction* 27 (1): 253–60. <https://doi.org/10.1095/biolreprod27.1.253>

Kennedy TG. 1977. "Evidence for a Role for Prostaglandins in the Initiation of Blastocyst Implantation in the Rat." *Biology of Reproduction* 16 (3): 286–291. <https://doi.org/10.1095/biolreprod16.3.286>.

Khan Muhammad Z. 2014. "Mechanism Linking Diabetes Mellitus and Obesity." *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* 4:7 (201): 587–91. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S67400>.

Kim S y Kim J. 2017. "A Review of Mechanisms of Implantation." *Dev Reprod* 21 (4): 351–59. <https://doi.org/10.12717/DR.2017.21.4.351>.

Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL y Dang CV. 2006. "HIF-1-Mediated Expression of Pyruvate Dehydrogenase Kinase : A Metabolic Switch Required for Cellular Adaptation to Hypoxia." *CELL METABOLISM*, no. March: 177–85. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.02.002>.

Kimber SJ y Spanswick C. 2000. "Blastocyst Implantation: The Adhesion Cascade." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 11 (2): 77–92. <https://doi.org/10.1006/scdb.2000.0154>.

King BM. 2006. "The Rise, Fall, and Resurrection of the Ventromedial Hypothalamus in the Regulation of Feeding Behavior and Body Weight." *Physiology & Behavior* 87 (2): 221–44. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.10.007>.

Kleinert M, Clemmensen C, Hofmann SM, Moore MC, Renner S, Woods SC, Huypens P, Beckers J, de Angelis MH, Schürmann A, Bakhti M, Klingenspor M, Heiman M, Cherrington AD, Ristow M, Lickert H, Wolf E, Havel PJ, Müller TD y Tschöp MH. 2018. "Animal Models of Obesity and Diabetes Mellitus." *Nature Publishing Group* 14 (3): 140–62. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.161>.

Krishan, P y Singh Randhir. 2011. "Obesity and Associated Disorders." *Pharmacology online* 2 2: 296–308.

Kuijsters NPM, Methorst WG, Kortenhorst MSQ, Rabotti C, Mischi M, Benedictus Christiaan Schoot. "Uterine peristalsis and fertility: current knowledge and future perspectives: a review and meta-analysis". 2017. *Reproductive Biomedicine online*. V 35, Issue 1, Pages 50–71 <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.03.019>

Lafontan M y Berlan M. 1993. "Fat Cell Adrenergic Receptors and the Control of White and Brown Fat Cell Function." *Journal of Lipid Research* 34: 1057–91. <http://www.jlr.org/content/34/7/1057.long>

Lashen H, Fear K y Sturdee DW. 2004. "Obesity Is Associated with Increased Risk of First Trimester and Recurrent Miscarriage: Matched Case-Control Study." *Human Reproduction (Oxford, England)* 19 (7): 1644–46. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh277>.

Lathi RB, Hess AP, Tulac S, Nayak NR, Conti M, and Giudice LC. 2005. "Dose-Dependent Insulin Regulation of Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-1 in Human Endometrial Stromal Cells Is Mediated by Distinct." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 90 (3): 1599–1606. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-1676>.

Laws MJ, Taylor RN, Sidell N, Demayo FJ, Lydon JP, Gutstein E, Bagchi MK y Bagchi IC. 2009. "Gap Junction Communication between Uterine Stromal Cells Plays Critical Role in Pregnancy-Associated Neovascularization and Embryo Survival." *Development* 135 (15): 2659–68. <https://doi.org/10.1242/dev.019810.Gap>.

Lean SC, Hayley D, Jones RL y Heazell AEP. 2011. "Advanced Maternal Age and Adverse Pregnancy Outcomes : A Systematic Review and Meta-Analysis." *PLOS ONE* 12 (10): 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186287>.

Legrand C y Maltier JP. 1986. "Evidence for a Noradrenergic Transmission in the Control of Parturition in the Rat." *Journal of Reproduction and Fertility* 76 (1): 415–24. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3080594>

Legrand C, Banuelos-Nevarez A, Rigolot C y Maltier JP. 1987. "Comparative Effects of 6-Hydroxydopamine and Alpha-Adrenoceptor Antagonists on Intrauterine Migration and Spacing of Blastocysts in the Rat." *Journal of Reproduction and Fertility* 81 (1): 51–58. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3118016>

Leibowitz SF, Alexander J, Dourmashkin JT, Hill JO, Gayles EC, Chang GQ. 2005. "Phenotypic Profile of SWR/J and A/J Mice Compared to Control Strains: Possible Mechanisms Underlying Resistance to Obesity on a High-Fat Diet." *Brain Research* 1047 (2): 137–47. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.03.047>.

Levin BE, Dunn-Meynell AA, Balkan B y Keeseey RE. 1997. "Selective Breeding for Diet-Induced Obesity and Resistance in Sprague-Dawley Rats." *The American Journal of Physiology* 273 (2 Pt 2): R725-30. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1997.273.2.R725>.

Levin BE y Keeseey RE. 1998. "Defense of Differing Body Weight Set Points in Diet-Induced Obese and Resistant Rats." *The American Journal of Physiology* 274 (2 Pt 2): R412-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9486299>

Lim HJ y Wang H. 2010. "Uterine Disorders and Pregnancy Complications: Insights from Mouse Models." *The Journal of Clinical Investigation* 120 (4): 1004–15. <https://doi.org/10.1172/JCI41210>.

Lima PDA. 2015. "The Cycling and Pregnant Mouse: Gross Anatomy." In *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*, edited by and S.L.Adamson B.A. Croy, A.T Yamada, F.J. DeMayo.

Liu Y, Nwosu UC y Rice PJ. 1998. "Relaxation of Isolated Human Myometrial Muscle by β 2 -Adrenergic Receptors but Not β 1 -Adrenergic Receptors." *Am J Obstet Gynecol* 179 (4): 6–9.

Lladó I, Rodríguez-Cuenca S, Pujol E, Monjo M, Estrany ME, Roca P, Palou A. 2002. "Gender Effects on Adrenergic Receptor Expression and Lipolysis in White Adipose Tissue of Rats." *Obes Res* 10 (4). <https://doi.org/10.1038/oby.2002.41>.

Lloyd GER (Ed.). 1978. *Hippocratic Writings*. London: Penguin Books.

Locke AE, Kahali B [...], Speliotes EK. "Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology" .2015. *Nature* volume518, pages 197–206. <https://www.nature.com/articles/nature14177>

Lutz TA y Woods SC. 2013. "Overview of Animal Models of Obesity." *Curr Protoc Pharmacol*. Author Manuscript, 1–22. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0561s58.Overview>.

Maheshwari A. 2010. "Overweight and Obesity in Infertility: Cost and Consequences." *Human Reproduction Update* 16 (3): 229–30. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmp058>.

Mali PY, Bigoniya P, Panchal SS, Muchhandi IS. 2013. "Anti-Obesity Activity of Chloroform-Methanol Extract of *Premna Integrifolia* in Mice Fed with Cafeteria Diet." *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences* 5 (3): 229–36. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.116825>.

Marcondes FK, Bianchi FJy Tanno AP. 2002. "Determination of the Estrous Cycle Phases of Rats: Some Helpful Considerations." *Braz J Biol* 62: 1–6. <http://www.scielo.br/pdf/bjb/v62n4a/a08v624a.pdf>.

- Markiewicz W, Jaroszewski JJ. 2016 “ β - and β -adrenergic receptors stimulation relaxes porcine myometrium in the peri-implantation period”. American Society of Animal Science, 4611–18. DOI: 10.2527/jas.2016-0577.
- Meldrum DR, Morris MA y Gambone JC. 2017. “Obesity Pandemic: Causes, Consequences, and Solutions-but Do We Have the Will?” *Fertility and Sterility* 107 (4): 833–39. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.02.104>.
- Mihajlovic AI y Bruce AW. 2017. “The First Cell-Fate Decision of Mouse Preimplantation Embryo Development: Integrating Cell Position and Polarity.” *Open Biology* 7 (11). <https://doi.org/10.1098/rsob.170210>.
- Ministerio de Salud de la Nación. 2013. Tercera Encuesta Nacional de Factores de Riesgo Para Enfermedades No Transmisibles. http://www.msal.gov.ar/images/stories/bes/graficos/0000000544cnt-2015_09_04_encuesta_nacional_factores_riesgo.pdf
- Mitchel JS y Keeseey RE. 1977. “Defense of a Lowered Weight Maintenance Level by Lateral Hypothamically Lesioned Rats: Evidence from a Restriction-Refeeding Regimen.” *Physiology & Behavior* 18 (6): 1121–25. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(77\)90020-8](https://doi.org/10.1016/0031-9384(77)90020-8).
- Moragianni VA, Jones SM, Ryley DA. 2012. “The Effect of Body Mass Index on the Outcomes of First Assisted Reproductive Technology Cycles.” *Fertility and Sterility* 98 (1): 102–8. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.04.004>.
- Morris MJ, Chen H, Watts R, Shulkes A, Cameron-Smith D. 2008. “Brain Neuropeptide Y and CCK and Peripheral Adipokine Receptors: Temporal Response in Obesity Induced by Palatable Diet.” *International Journal of Obesity* 32 (2): 249–58. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803716>.
- Morris NF. 1968. “Biology of the Uterus.” *Nature* 217: 784–785. <https://doi.org/10.1038/217784b0>.
- Muñoz M, Sánchez A, Pilar Martínez M, Benedito S, López-Oliva ME, García-Sacristán A, Hernández M. 2015. “COX-2 Is Involved in Vascular Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction of Renal Interlobar Arteries from Obese Zucker Rats.” *Free Radical Biology and Medicine* 84: 77–90. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.024>.
- Naim M, Brand JG, Kare MR y Carpenter RG. 1985. “Energy Intake, Weight Gain and Fat Deposition in Rats Fed Flavored, Nutritionally Controlled Diets in a Multichoice (‘cafeteria’) Design.” *The Journal of Nutrition* 115 (11): 1447–58. <https://doi.org/10.1093/jn/115.11.1447>.
- Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, Mullany EC *et al.* 2014. “Global, Regional, and National Prevalence of Overweight and Obesity in Children and Adults during 1980 – 2013 : A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2013” 384. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60460-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60460-8).
- Neri C y Edlow AG. 2016. “Effects of Maternal Obesity on Fetal Programming : Molecular Approaches.” *Perspectives in Medicine*, no. 6: 1–21. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026591> Cite.
- Nilsson C, Raun K, Yan FF, Larsen MO, Tang-Christensen M. 2012. “Laboratory Animals as Surrogate Models of Human Obesity.” *Acta Pharmacologica Sinica* 33 (2): 173–81. <https://doi.org/10.1038/aps.2011.203>.

Olson KN, Redman LM y Sones JL. 2019. "Obesity 'Complements' Preeclampsia." *Physiological Genomics* 51 (3): 73–76. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00102.2018>.

Papka RE, Thompson BD y Schmidt Harald HHW. 1996. "Autonomic Nervous System Identification of Uterine-Related Sympathetic Neurons in the Rat Inferior Mesenteric Ganglion: Neurotransmitter Content and Afferent Input." *Journal of the Autonomic Nervous System* 59 (1–2): 51–59. [https://doi.org/10.1016/0165-1838\(96\)00003-3](https://doi.org/10.1016/0165-1838(96)00003-3).

Paria BC, Huet-Hudson YM y Dey SK. 1993. "Blastocyst 's State of Activity Determines the " Window " of Implantation in the Receptive Mouse Uterus." *Developmental Biology* 90 (November): 10159–62. <https://doi.org/10.2307/2363422>.

Parida S, Uttam Singh T, Ravi Prakash V, Mishra SK. 2013. "Molecular and Functional Characteristics of β_3 - Adrenoceptors in Late Pregnant Mouse Uterus: A Comparison with β_2 -Adrenoceptors." *European Journal of Pharmacology* 700 (1–3): 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.11.048>.

Peavey MC, Reynolds CL, Szwarc MM, Gibbons WE, Valdes T, Demayo FJ y Lydon JP. 2017. "Three-Dimensional High-Frequency Ultrasonography for Early Detection and Characterization of Embryo Implantation Site Development in the Mouse." *PLOS ONE*, 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169312>.

Pathi A, Esen U y Hildreth A. 2006. "A Comparison of Complications of Pregnancy and Delivery in Morbidly Obese and Non-Obese Women." *Journal of Obstetrics and Gynaecology: The Journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology* 26 (6): 527–30. <https://doi.org/10.1080/01443610600810914>.

Perry S y Rowlands IW. 1962. "EARLY PREGNANCY IN THE PIG." *Reproduction, Fertility* 4 (4): 175–88. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0040175>

Pijnenborg R, Vercruyse L y Hanssens M. 2006. "The Uterine Spiral Arteries in Human Pregnancy: Facts and Controversies." *Placenta* 27 (9–10): 939–58. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2005.12.006>.

Pijnenborga R, Robertson WB, Brosens I. 1985. "Morphological Aspects of Placental Ontogeny and Phylogeny." *Placenta* 6 (2): 155–62. [https://doi.org/10.1016/S0143-4004\(85\)80065-5](https://doi.org/10.1016/S0143-4004(85)80065-5).

Plut C, Ribiere C, Giudicelli Y, Dausse JP. 2002. "Gender Differences in Hypothalamic Tyrosine Hydroxylase and Alpha(2)-Adrenoceptor Subtype Gene Expression in Cafeteria Diet-Induced Hypertension and Consequences of Neonatal Androgenization." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 302 (2): 525–31. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.4881>.

Popkin BM, Reardon T. 2018. "Obesity and the Food System Transformation in Latin America." *Obesity Reviews* 19 (8): 1028–64. <https://doi.org/10.1111/obr.12694>.

Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX, Eckel RH; American Heart Association; Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. 2006. "Obesity and Cardiovascular Disease: Pathophysiology, Evaluation, and Effect of Weight Loss: An Update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical." *Circulation* 113 (6): 898–918. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.171016>.

Popkin BM. 2017. "Relationship between Shifts in Food System Dynamics and Acceleration of the Global Nutrition Transition." *Nutrition Reviews* 75 (2): 73–82. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuw064>.

Potts, DM. 1968. "The Ultrastructure of Implantation in the Mouse." *Journal Anatomy*, 77–90. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1231876/pdf/janat00402-0081.pdf>

Purcell SH y Moley KH. 2011. "The Impact of Obesity on Egg Quality," *J Assist Reprod Genet* 517–24. <https://doi.org/10.1007/s10815-011-9592-y>.

Pustovrh C, Villarroel C, Arriagada C, Muñoz A, Kohen P; Devoto L 2010. "Expresión y Función de Los Glucotransportadores En El Endometrio Humano : Efecto Del Síndrome de Ovario Poliquístico y El Tratamiento Con Metformina." *Revista de La Sociedad Argentina de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva*. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/21075>.

Quaegebeur A, Segura I, Schmieder R, Verdegem D, Decimo I, Bifari F, Dresselaers T, Eelen G, Ghosh D, Davidson SM, Schoors S, Broekaert D, Cruys B, Govaerts K, De Legher C, Bouché A, Schoonjans L *et. al.* 2017. "Deletion or Inhibition of the Oxygen Sensor PHD1 Protects against Ischemic Stroke via Reprogramming of Neuronal Metabolism." *CELL METABOLISM* 23 (2): 280–91. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4880550/>

Ramsay JE, Greer I y Sattarn N. 2006. "Obesity and Reproduction." *Bmj* 333: 1159–62. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20160037>.

Reinebrant HE, Pileggi-Castro C, Romero CLT, Dos Santos R AN, Kumar S, Souza JP y Flenady V. 2015. "Cyclo-Oxygenase (COX) Inhibitors for Treating Preterm Labour." *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, no. 6 (June): CD001992. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15846626>

Rimon-Dahari N, Yerushalmi-Heinemann L, Alyagor L y Dekel N. 2016. "Ovarian Folliculogenesis." *Results and Problems in Cell Differentiation* 58: 167–90. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31973-5_7.

Rittenberg V, Seshadri S, Sunkara SK, Sobaleva S, Oteng-Ntim E, El-Toukhy T. 2011. "Effect of Body Mass Index on IVF Treatment Outcome : An Updated Systematic Review And metaanalysis." *Reproductive BioMedicine Online* 23 (4): 421–39. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2011.06.018>.

Rizzo A, Spedicato M, Cosola C, Minoia G, Roscino MT, Punzi S y Sciorsci RL. 2009. "Effects of Rosiglitazone, a PPAR-Gamma Agonist, on the Contractility of Bovine Uterus in Vitro." *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 32 (6): 548–51. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2009.01074.x>.

Roberto CA, Swinburn B, Hawkes C, Huang TT, Costa SA, Ashe M, Zwicker L, Cawley JH y Brownell KD. 2015. "Patchy Progress on Obesity Prevention: Emerging Examples, Entrenched Barriers, and New Thinking." *The Lancet* 385 (9985): 2400–2409. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61744-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61744-X).

Roberts JM, Riemer RK, Bottari SP, Wu YY y Goldfien A. 1989. "Hormonal Regulation Myometrial Adrenergic Responses: The Receptor and Beyond." *Journal of Developmental Physiology* 11 (3): 125–34. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2553793>

Robker RL. 2008. "Evidence That Obesity Alters the Quality of Oocytes and Embryos." *Pathophysiology : The Official Journal of the International Society for Pathophysiology* 15 (2): 115–21. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2008.04.004>.

Rogers PA, Murphy CR, Squires KR y MacLennan AH. 1983. "Effects of Relaxin on the Intrauterine Distribution and Antimesometrial Positioning and Orientation of Rat Blastocysts before Implantation." *Journal of Reproduction and Fertility* 68 (2): 431–35. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6864659>

Roman H, Robillard PY, Hulsey TC, Laffitte A, Kouteich K, Marpeau L, Barau G. 2007. "Obstetrical and Neonatal Outcomes in Obese Women." *The West Indian Medical Journal* 56 (5): 421–26. doi: 10.3109/14767050903338472. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19895351>

Ross MH y Wojciech P. 2015. "Sistema Genital Femenino-Útero." In *Histología. Texto y Atlas. Correlación Con Biología Molecular y Celular*, 7th ed., 913–20.

Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, Newgard CB y Makowski L. 2011. "Cafeteria Diet Is a Robust Model of Human Metabolic Syndrome with Liver and Adipose Inflammation: Comparison to High-Fat Diet." *Obesity* 19 (6): 1109–17. <https://doi.org/10.1038/oby.2011.18>.

Sarrible GB, Bazzano MV, Massara D y Elia EM. 2018. "Coenzyme Q10 Restores the Obesity-Decreased Ovulation Rates." *XX Jornadas Anuales de La Sociedad Argentina de Biología (SAB)-XVII Jornadas de La Sociedad Uruguaya de Biociencias (SUB), Segundas Jornadas Rioplatenses de Biología, Buenos Aires; 7 de Diciembre de 2018*.

Schapira DV, Clark RA, Wolff PA, Jarrett AR, Kumar NB, Aziz NM. 1994. "Visceral Obesity and Breast Cancer Risk." *Cancer* 74 (2): 632–39. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8033042>.

Schlafke S y Enders AC. 1975. "Cellular Basis of Interaction between Trophoblast and Uterus at Implantation." *Biology of Reproduction* 12 (1): 41–65. <https://doi.org/10.1095/biolreprod12.1.41>

Scialli AR; Public Affairs Committee of the Teratology Society. 2006. "Teratology Public Affairs Committee Position Paper: Maternal Obesity and Pregnancy." *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology* 76 (2): 73–77. <https://doi.org/10.1002/bdra.20236>.

Sclafani A y Springer D. 1976. "Dietary Obesity in Adult Rats: Similarities to Hypothalamic and Human Obesity Syndromes." *Physiology & Behavior* 17: 461–71. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(76\)90109-8](https://doi.org/10.1016/0031-9384(76)90109-8)

Sakamoto K, McCarthy A, Smith D, Green KA, Grahame Hardie D, Ashworth A, Alessi DR.. 2005. "Deficiency of LKB1 in Skeletal Muscle Prevents AMPK Activation and Glucose Uptake during Contraction." *EMBO Journal* 24 (10): 1810–20. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600667>.

Scully RE, Bonfiglio TA, Kurman RJ, Silverberg SG y Wilkinson EJ. 1994. "Histological Typing of Female Genital Tract Tumours (International Histological Classification of Tumours)." *Geneva*, edn 2, p. 13–18.

Semenza GL. 2004. "Hydroxylation of HIF-1 : Oxygen Sensing Control of Oxygen-Regulated Gene." *PHYSIOLOGY*, 176–82. <https://doi.org/10.1152/physiol.00001.2004>.

Semenza GL. 2010. "Defining the Role of Hypoxia-Inducible Factor 1 in Cancer Biology and Therapeutics." *Oncogene* 29 (5): 625–34. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.441>.

Semenza GL. 2011. "Oxygen Sensing, Homeostasis, and Disease." *New England Journal of Medicine* 365 (6): 537–47. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1011165>.

Setiawan VW, Yang HP, Pike MC, McCann SE, Yu H, Xiang YB, Wolk A, Wentzensen N, Weiss NS, Webb PM, van den Brandt PA, van de Vijver K, Thompson PJ; Australian National Endometrial Cancer Study Group, Strom BL, Spurdle AB *et al.* 2013. "Type I and II Endometrial Cancers: Have They Different Risk Factors?" *Journal of Clinical Oncology* 31 (20): 2607–18. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.48.2596>.

Shafat A, Murray B y Rumsey D. 2009. "Energy Density in Cafeteria Diet Induced Hyperphagia in the Rat." *Appetite* 52 (1): 34–38. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2008.07.004>.

Shah DK, Missmer SA, Berry KF, Racowsky C, Ginsburg ES. 2011. "Effect of Obesity on Oocyte and Embryo Quality in Women Undergoing in Vitro Fertilization." *Obstetrics and Gynecology* 118 (1): 63–70. <https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e31821fd360>.

Sibuyi NRS, Meyer M, Onani MO y Skepu A. 2018. "Vascular Targeted Nanotherapeutic Approach for Obesity Treatment." *International Journal of Nanomedicine* 13: 7915–29. <https://doi.org/10.2147/IJN.S173424>.

Simmons DG y Cross JC. 2005. "Determinants of Trophoblast Lineage and Cell Subtype Specification in the Mouse Placenta." *Developmental Biology* 284 (1): 12–24. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.05.010>.

Simon C, Martin JC y Pellicer A. 2000. "Paracrine Regulators of Implantation." *Bailliere's Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology* 14 (5): 815–26. <https://doi.org/10.1053/beog.2000.0121>.

Singh R, Prakash M, Dubey R, Roy K, Kotwal A. 2013. "Body Composition Parameters as Correlates of Coronary Artery Disease." *The Indian Journal of Medical Research* 138 (6): 1016–19. <https://doi.org/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3978954/>.

Skaznik-wikiel ME, Swindle DC, Allshouse AA, Polotsky AJ y Mcmanaman L. 2016. "High-Fat Diet Causes Subfertility and Compromised Ovarian Function Independent of Obesity in Mice" *Biol. Reprod.* 94 (March): 1–10. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.137414>.

Soares MJ, Chakraborty D, Karim Rumi MA, Konno T y Renaud SJ. 2012. "Rat Placentation: An Experimental Model for Investigating the Hemochorial Maternal-Fetal Interface." *Placenta* 33 (4): 233–43. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.11.026>.

Sordelli, MS, Beltrame JS, Cella M, Gracia Gervasi M, Perez Martinez S, Burdet J, Zotta E, Franchi AM y Ribeiro ML. 2012. "Interaction between Lysophosphatidic Acid, Prostaglandins and the Endocannabinoid System during the Window of Implantation in the Rat Uterus" *PLOS ONE* 7 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046059>.

Song H, Lim H, Paria BC, Matsumoto H y Swift LL. 2002. "Cytosolic Phospholipase A 2 α Deficiency Is Crucial for 'on-Time' Embryo Implantation That Directs Subsequent Development." *Development* 129: 2879–89. <http://dev.biologists.org/content/develop/129/12/2879.full.pdf>

Sookvanichsilp N y Pulbutr P 2002. "Anti-Implantation Effects of Indomethacin and Celecoxib in Rats." *Contraception* 65: 373–78. [https://doi.org/10.1016/S0010-7824\(01\)00322-5](https://doi.org/10.1016/S0010-7824(01)00322-5).

Sørensen HT, Sabroe S, Rothman KJ, Gillman M, Fischer P y Sørensen TI 1997. "Relation between Weight and Length at Birth and Body Mass Index in Young Adulthood : Cohort Study." *British Medical Journal / British Medical Association*. 315 (NOVEMBER): 1997. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2127730/>

Speakman J, Hambly C, Mitchell S y Król E. 2008. "Contribución de Los Modelos Animales Al Estudio de La Obesidad." *The International Journal of Laboratory Animals Science and Welfare* 3. <https://doi.org/Laboratory Animals>. 42, 423-432.

Spencer TE, Dunlap KA y Filant J 2012. "Comparative Developmental Biology of the Uterus: Insights into Mechanisms and Developmental Disruption." *Molecular and Cellular Endocrinology* 354 (1–2): 34–53. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.09.035>.

Sperelakis N, Inoue Y y Ohya Y. 1992. "Fast Na⁺ Channels in Smooth Muscle from Pregnant Rat Uterus." *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 70 (4): 491–500. <https://doi.org/10.1139/y92-064>.

Srdic B, Stokic E, Korac A, kropinaMU, Velickovic K y Breberina M. 2010. "Morphological Characteristics of Abdominal Adipose Tissue in Normal-Weight and Obese Women of Different Metabolic Profiles." *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes: Official Journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 118 (10): 713–18. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1254165>.

Stamenov GS y Parvanov DA. 2018. "Successful Pregnancy Following Mixed Double Embryo Transfer in a Patient with Variable Window of Implantation." *Obstetrics and Gynecology* 2018 (July 2016): 2–5. <https://doi.org/10.1155/2018/1687583>.

Stang, J y Huffman LG. 2016. "Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Obesity, Reproduction, and Pregnancy Outcomes." *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* 116 (4): 677–91. <https://doi.org/10.1016/J.JAND.2016.01.008>.

Strauss JF y Barbieri RL. 2009. *Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management*. Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology. Vol. Book • 6th.

van der Steeg JW, Steures P, Eijkemans MJ, Habbema JD, Hompes PG, Burggraaff JM, Oosterhuis GJ, Bossuyt PM, Van der Veen F y Mol BW. 2008. "Obesity Affects Spontaneous Pregnancy Chances in Subfertile, Ovulatory Women." *Human Reproduction* 23 (2): 324–28. DOI:10.1093/humrep/dem371

Strangeways Research Laboratory, Cambridge. 1966. "DEVELOPMENT OF RAT EMBRYOS CULTURED IN BLOOD SERA." *Reproduction, Fertility*, no. March. <https://doi.org/10.1.1.322.3477&rep=rep1&type=pdf>.

Supriya Ch y Reddy PS. 2015. "Prenatal Exposure to Aflatoxin B1: Developmental, Behavioral, and Reproductive Alterations in Male Rats." *Science of Nature* 102 (5–6). <https://doi.org/10.1007/s00114-015-1274-7>.

Swinburn BA, Caterson I, Seidell JC y James WP. 2004. "Diet, Nutrition and the Prevention of Excess Weight Gain and Obesity." *Public Health Nutrition* 7 (1A): 123–46. <https://doi.org/10.1079/PHN2003585>.

Szabo AJ. 2019. "Transferred Maternal Fatty Acids Stimulate Fetal Adipogenesis and Lead to Neonatal and Adult Obesity." *Medical Hypotheses* 122 (January): 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2018.10.022>.

UdelaR. 2018. "Departamento de Histología y Embriología Facultad de Medicina - Universidad de La República-Uruguay." Galería de Imagenes-Histología. 2018. <http://www.histoemb.fmed.edu.uy/galeria>.

Vadiveloo M, Scott M, Quatromoni P, Jacques P, Parekh N. 2014. "Trends in Dietary Fat and High-Fat Food Intakes from 1991 to 2008 in the Framingham Heart Study Participants." *British Journal of Nutrition* 111 (4): 724–34. <https://doi.org/10.1017/S0007114513002924>.

Vitti M, Di Emidio G, Di Carlo M, Carta G, Antonosante A, Artini PG, Cimini A, Tatone C y Elisabetta Benedetti. 2016. "Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Female Reproduction and Fertility." *PPAR Research* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4612306>.

Walker CL. 2011. "Epigenomic Reprogramming of the Developing Reproductive Tract and Disease Susceptibility in Adulthood." *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology* 91 (8): 666–71. <https://doi.org/10.1002/bdra.20827>.

Wang H y Dey KS. 2006. "Roadmap to Embryo Implantation : Clues from Mouse Models." *NATURE REVIEWS | GENETICS* 7 (March): 185–99. <https://doi.org/10.1038/nrg1808>.

Wei JN, Sung FC, Li CY, Chang CH, Lin RS, Lin CC, Chiang CC y Chuang LM. 2003. "Low Birth Weight and High Birth Weight Infants Are Both at an Increased Risk to Have Type 2 Diabetes Among Schoolchildren in Taiwan." *Diabetes Care* 26 (2): 343–48.

Weiss JL, Malone FD, Emig D, Ball RH, Nyberg DA, Comstock CH, Saade G, Eddleman K, Carter SM, Craigo SD, Carr SR, D'Alton ME; FASTER Research Consortium. 2004. "Obesity, Obstetric Complications and Cesarean Delivery Rate--a Population-

West DB, Boozer CN, Moody DL y Atkinson RL. 1992. "Dietary Obesity in Nine Inbred Mouse Strains." *The American Journal of Physiology* 262 (6 Pt 2): R1025-32. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1992.262.6.R1025>.

Westwood FR. 2008. "The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging." *Toxicologic Pathology*. <https://doi.org/10.1177/0192623308315665>.

Wilson L Jr. 1983. "Effects of Estradiol and Progesterone on Uterine Prostaglandin Levels in the Pregnant Rat." *Prostaglandins* 26 (1): 47–54. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6635211>

Wimsatt WA. 1975. "Some Comparative Aspects of Implantation." *Biology of Reproduction* 12 (1): 1–40. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/806310>

Witschi E. 1962. "Development: Rat. In: Growth. VII. Prenatal Vertebrate Development." In , edited by Washington. Eds. Altman and Dittmer. *Biological Handbooks of the Federation of American Societies for Experimental Biology*.

Wittemer C, Ohl J, Bailly M, Bettahar-Lebugle K y Nisand I. 2000. "Does Body Mass Index of Infertile Women Have an Impact on IVF Procedure and Outcome?" *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 17 (10): 547–52. Doi: 10.1023/A:1026477628723

Wolff MV, Ursel S, Hahn U, Steldinger R y Strowitzki T. 2003. "Glucose Transporter Proteins (GLUT) in Human Endometrium: Expression, Regulation, and Function throughout the Menstrual Cycle and in Early Pregnancy." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88 (8): 3885–92. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-021890>.

Wood GA, Fata JE, Watson KL M y Khokha Rama. 2007. "Circulating Hormones and Estrous Stage Predict Cellular and Stromal Remodeling in Murine Uterus." *Reproduction (Cambridge, England)* 133 (5): 1035–44. <https://doi.org/10.1530/REP-06-0302>.

World Health Organization (WHO). 2018. "Obesity and Overweight." <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.

Wray S, Kupittayanant S, Shmygol A, Smith RD, Burdyga T. 2001. "The Physiological Basis of Uterine Contractility: A Short Review." *Experimental Physiology* 86 (2): 239–46. <https://doi.org/10.1113/eph8602114>.

Yao X, Khanh HN y .Grégoire Nyomba BL 2014. "Reversal of Glucose Intolerance in Rat Offspring Exposed to Ethanol before Birth through Reduction of Nuclear Skeletal Muscle HDAC Expression by the Bile Acid TUDCA." *Physiological Reports* 2 (12): 1–15. <https://doi.org/10.14814/phy2.12195>.

Ye X, Hama K, Contos JA, Anliker B, Inoue A, Skinner K, Suzuki H, Amano S, Kennedy G y Arai H. 2006. "LPA3-Mediated Lysophosphatidic Acid Signalling in Implantation and Embryo Spacing." *Nature* 435 (7038): 104–8. <https://doi.org/10.1038/nature03505>.

Ye X, Herr DR, Diao H, Rivera R, Chun J. 2011. "Unique Uterine Localization and Regulation May Differentiate LPA3 from Other Lysophospholipid Receptors for Its Role in Embryo Implantation." *Fertility and Sterility* 95 (6): 2107–13, 2113.e1-4. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.02.024>.

Yen P. 2001. "The Fragility of Fertility." *Nature Genetics*. United States. <https://doi.org/10.1038/ng1101-243>.

Young RC. 2018. "The Uterine Pacemaker of Labor." *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology* 52 (October): 68–87. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2018.04.002>.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. 1994. "Positional Cloning of the Mouse Obese Gene and Its Human Homologue." *Nature* 372 (6505): 425–32. <https://doi.org/10.1038/372425a0>

Zhang H, Zhang G, Gonzalez FJ, Park S y Cai D. 2011. "Hypoxia-Inducible Factor Directs POMC Gene to Mediate Hypothalamic Glucose Sensing and Energy Balance Regulation." *PLoS Biology* 9 (7): 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001112>.

Zhang Y, Sun X, Sun X, Meng F, Hu M, Li X, Li W *et al.* 2016. "Molecular Characterization of Insulin Resistance and Glycolytic Metabolism in the Rat Uterus." *Scientific Reports* 6: 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep30679>.

Zubrick SR. 2008. "Maternal Affective or Substance Disorders Are Risk Factors for Subsequent Pregnancy Loss." *Evidence-Based Mental Health* 11 (1): 29. <https://doi.org/10.1136/ebmh.11.1.29>.

Zucker LM y Zucker TF. 1961. "Fatty, a New Mutation in the Rat." *Journal of Heredity* 52 (6): 275–278. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a107093>