FACULTAD DE FARMACIA

ESCUELA DE NUTRICIÓN Y DIETETICA

“EXPRESIÓN OVÁRICA DE CYP19 Y CAPACIDAD OVÁRICA DE SECRECIÓN DE ESTRADIOL EN RATAS DESCENDIENTES DE MADRES OBESAS EN COMPARACIÓN CON RATAS CONTROLES”.

LUISA AMANDA RAMÍREZ ARAYA

Tesis para optar al título de profesional Nutricionista

Grado académico de Licenciado de Nutrición y Dietética

DIRECTOR: GONZALO CRUZ NECULPÁN PhD

Valparaíso, 2014.

Dedicado a ustedes, que me dieron la oportunidad de aprender. Queridos padres fueron un apoyo constante y fundamental en mis logros, muchas gracias.
Dedicado a dos bellas mujeres, Débora Gutiérrez y Belén Contreras.
Y dedicado a ti, que me apoyaste, cuidaste y sacaste más que una sonrisa. Eres mi presente más alegre y quiero que lo sigas siendo.

Amanda Ramírez Araya

Agradecimientos

Gracias a una persona conocí un área de la ciencia que creí muy lejana y difícil de aprender. Incentivo mi curiosidad en querer saber más, y dar con la respuesta a cada pregunta que nacía después de un nuevo aprendizaje. Siempre me entrego confianza en mí, cuando la dejaba olvidada en el camino. Esa persona eres tú, muchas gracias Gonzalo.

A mis compañeros de laboratorio, que fueron una ayuda importantísima para lograr los avances que tenemos hoy. Especialmente a Daniela A. y Sofía, por su buena disposición, compañía y contribución a mi tesis. Tania, Jonathan, Daniela F., profe Ramón y profe Geo gracias por su paciencia y enseñanzas. Pedro, uno de los primeros que contribuyo a mi aprendizaje en un área nueva para mi, muchas gracias. Favian, Leo, Luchito, Nico y Raúl, sus consejos y buen sentido del humor alivianaron mis días de trabajo.

Marcelo y Valery, uds pueden lograr cosas aún más grandes que su tesis, pueden y lo harán.

Mi compañero de días, noches y fin de semanas interminables de trabajo, que fueron mucho mejores junto a ti, gracias Aldo.

Financiamiento

Esta tesis fue financiada principalmente por el proyecto FONDECYT INICIACION 11130707 del programa FONDECYT, CONICYT.

Parte del financiamiento de esta tesis se obtuvo del Centro de Neurobiología y Plasticidad Cerebral (CNPC) de la Universidad de Valparaíso.

Agradecemos el apoyo de la Dirección de Investigación de la Universidad de Valparaíso.

Índice

Resumen 7

Abstract 9

Introducción 11

Hipótesis 17

Objetivos 18

Objetivo General 18

Objetivos Específicos 18

Metodología 19

1. Diseño experimental 19
2. Control de peso 21
3. Incubación de ovarios ex-vivo 21
4. Determinación de los niveles séricos de estradiol por Inmuno-ensayo ligado a enzima (ELISA) 21
5. Expresión de cyp19 por PCR en tiempo real. 22
6. Análisis Estadístico. 22

Resultados 24

1. Evaluación de peso corporal en ratas descendientes de madres obesas comparadas con controles a los 30 y 60 días de edad. 24
2. Niveles sérico de estradiol en ratas descendientes de madres obesas comparadas con controles a los 30 y 60 días de edad. 26
3. Niveles de RNAm de aromatasa en ratas descendientes de madres obesas comparadas con controles a los 30 días de edad. 28

4. Secreción ovárica de estradiol en ratas descendientes de madres obesas comparadas con controles a los 30 días de edad 29
Discusión 31
Conclusiones 36
Referencias 37
Anexos 47

Resumen

El sobrepeso y la obesidad de la madre durante la gestación son condiciones cuya prevalencia se encuentra en aumento en Chile y el mundo. La obesidad materna tiene un impacto inmediato sobre el desarrollo normal del embarazo, que puede trascender a la generación posterior contribuyendo al desarrollo de obesidad y enfermedades crónicas no transmisibles. Una mayor producción de estradiol a nivel ovárico podría explicar diversas alteraciones que ocurren en ratas hijas de madres obesas tratadas con una dieta alta en grasa, tales como la pubertad adelantada y un menor desarrollo folicular. Modelos experimentales evidencian que la administración de agentes estrogénicos durante el desarrollo induce un aumento de la expresión de la enzima aromatasa en distintos tejidos durante la adultez. Según los antecedentes expuestos hemos planteado la hipótesis de que la obesidad inducida por una dieta alta en grasa previo y durante la gestación y lactancia incrementa la expresión ovárica de aromatasa y la secreción ovárica de estradiol en ratas pre-púberes y adultas descendientes. El principal objetivo de este estudio es determinar la expresión ovárica de *cyp19* y la capacidad ovárica de secreción de estradiol en ratas de 30 y 60 días descendientes de madres obesas (HF), en comparación con ratas controles. Para ello se cuantificó la expresión de *cyp19* en ovario por PCR en tiempo real. La capacidad ovárica de secreción de estradiol se determinó por medio de la incubación de ovarios *ex-vivo.* Se determinaron los niveles séricos de estradiol por ELISA. Para los análisis estadísticos se utilizó T-student y Two-way ANOVA. No se observó cambios en los niveles de ARNm de *cyp19* y tampoco en la secreción ovárica de estradiol en el grupo HF comparado con el grupo control. Hubo un aumento en la concentración de estradiol sérico a los 30 días de

edad, y un aumento del peso corporal en ratas hijas de madres obesas a los 30 y 60 días de edad. Por lo tanto, el aumento de estradiol sérico en hijas de madres obesas no es producto de una mayor aromatización ovárica de testosterona a estradiol, sino que podrían deberse a una aromatización en otros tejidos como el tejido graso. Una proyección a corto plazo de este trabajo evalúa medir la expresión de *cyp19* en tejido graso y además analizar los niveles de la proteína aromatasa.

Abstract

Maternal overweight and obesity during pregnancy are conditions whose prevalence is increasing in Chile and the world. Maternal obesity has an immediate impact on the normal development of pregnancy, which can transcend to the next generation. It has been shown in experimental models that administration of estrogenic agents during development induces increased expression of the aromatase enzyme in different tissues during adulthood. Increased production of ovarian estrogen level could explain various alterations that occur in rats daughters of obese mothers treated with a diet high in fat such as early puberty and reduced follicular development. According to the above background we hypothesized that obesity induced by a high fat diet before and during pregnancy and lactation increases ovarian aromatase expression and ovarian estradiol secretion in prepubertal and adult rat offspring. The main objective of this study was to assess ovarian *cyp19*expression and ovarian estradiol secretion capacity in rats of 30 days and 60 days old descendent from obese mothers (HF) rats compared to controls. *Cyp19* expression in the ovaries was quantified by real-time PCR. Evaluation of the ovarian estradiol secretion capacity was performed by ex-vivo incubation of the ovaries. Serum estradiol levels were determined by ELISA. Statistical analyzes were performed using T-student or Two-way ANOVA. No changes were observed in the levels of *cyp19* mRNA and in ovarian secretion of estradiolHF rats compared to controls. In addition, there was an increase in the serum concentration of estradiol at 30 days old, and a higher weight in HF rats at 30 and 60 days old. Therefore, increased in estradiol HF rats is not due to greater ovarian aromatization of testosterone to estradiol, but may be due to an aromatization of testosterone to estradiol in

other tissues, such as fat. A short-term projection of this work is to evaluate the expression of *cyp19* in fat tissue and also analyze the aromatase protein levels.

Introducción

Las tasas de obesidad en el mundo se han más que duplicado y casi triplicado desde el año 1980 hasta hoy. La obesidad ha sido descrita por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una pandemia, siendo el problema de salud pública que aqueja tanto a países desarrollados como en aquellos que están en vías de desarrollo, especialmente en las áreas urbanas [1].

Cada año fallecen 2,8 millones de personas en el mundo a causa de la malnutrición por exceso de nutrientes [2]. Dentro de los países desarrollados en que ha incrementado la obesidad, Estados Unidos presenta niveles de obesidad alarmantes, con un 35,7% de adultos obesos en la actualidad [3].

Chile no escapa a esta realidad, el 67% de la población adulta presenta algún grado de malnutrición por exceso de nutrientes según la Encuesta Nacional de Salud del año 2010 [4]. De este grupo de individuos que presenta malnutrición por exceso, el 25,1% son obesos. La obesidad presenta diferencias por sexo, siendo el 30,7% de los individuos obesos mujeres y el 19,2% hombres. Además, existe una relación inversamente proporcional entre el nivel socioeconómico y educacional de la población [4].

Actualmente, cerca de 35 millones de niños se encuentran con sobrepeso y obesidad en los países en vías de desarrollo, mientras que esta cifra desciende a 8 millones de niños en países desarrollados [2]. En Chile, la prevalencia de obesidad en menores de 6 años alcanzo por primera vez los dos dígitos en el año 2013, con un 10,3% [5].

La obesidad es definida como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. Un Índice de Masa Corporal (IMC) igual o superior a 30 kg/m^2 [2] es el criterio diagnóstico actual para declarar obesidad en personas adultas. A nivel mundial, la media del IMC ha ido aumentando desde el año 1980 en aproximadamente 0,4 por kg/m^2 por década [6]. Este aumento de IMC se relaciona además con el riesgo de padecer enfermedades crónicas de diversos tipos; por ejemplo: el exceso de peso es un factor que predispone al desarrollo de enfermedades como hipertensión arterial, dislipidemia, diabetes mellitus tipo 2 y síndrome metabólico [7, 8]. Estas afecciones dan cuenta del 45% de la carga de enfermedades a nivel global [2]. En nuestro país las enfermedades cardiovasculares se presentan como la primera causa de muerte, dentro de ellas la enfermedad isquémica del corazón y la enfermedad cerebrovascular son las principales causas [9].

La prevalencia de obesidad alcanzó el 35,8 % entre mujeres estadounidenses mayores de 20 años [3], es más, el aumento de la obesidad en las mujeres de edad fértil (20-44 años) se ha vuelto común en el mundo. Estas alarmantes cifras proyectan un probable aumento de la obesidad en madres gestantes a nivel global. En Chile más del 50% de las mujeres embarazadas controladas en el Sistema Nacional de Servicio de la Salud (SNSS) presenta sobrepeso u obesidad. Peor aún, se observa un fuerte incremento de la obesidad durante la gestación a medida que aumenta la edad de la madre, triplicándose la prevalencia en un lapso menor a 20 años [10].

El creciente número de embarazadas obesas genera gran preocupación debido a las implicancias de esta patología sobre la gestación, el parto y el desarrollo del feto [11, 12].

Por ejemplo, la obesidad durante la gestación aumenta el riesgo de diabetes gestacional, preeclampsia [11, 13], insuficiencia placentaria, macrosomía, parto prematuro, muerte fetal [11, 12, 14], hiperandrogenismo, y aborto espontáneo durante el primer trimestre de embarazo [15, 16]. Por otra parte, la obesidad aumenta el número de intentos fallidos de fertilización *in vitro* [16].

El impacto de la obesidad durante la gestación no se restringe solamente al periodo gestacional o posnatal temprano, sino que se perpetúa hasta la adultez [14]. En este contexto, los cambios fisiológicos de un órgano o tejido ante un estímulo o injuria durante períodos sensibles del desarrollo fetal resultan en consecuencias funcionales adversas a largo plazo en la descendencia. A este efecto se le denomina “Reprogramación Fetal” o “Programming" [17]. Una de las primeras observaciones epidemiológicas relacionadas a la reprogramación fetal de patologías específicas fue el trabajo realizado por Barker y cols. En este trabajo son discutidos efectos tales como la obesidad, hipertensión arterial, resistencia a la insulina y dislipidemia como afecciones de la descendencia de madres obesas [18, 19]. El aumento del IMC materno previo y durante el embarazo se asocian con sobrepeso, obesidad [20-22] y factores de riesgo cardiometabólicos como un incremento en la adiposidad [23] en la descendencia. Efectos similares han sido ampliamente descritos en modelos animales de obesidad materna durante la preñez y la lactancia [24]. Ratas descendientes de madres alimentadas con una dieta alta en grasa presentan obesidad, hiperleptinemia y resistencia a la insulina independiente de su dieta postnatal [25]. Es más, se ha descrito que la descendencia de madres obesas presenta mayor cantidad de tejido graso (adiposidad) [26], hipertensión [27] [28], esteatosis hepática no alcohólica [29, 30] y

un perfil lipídico alterado [31] cuando se las compara con ratas descendientes de madres no obesas. Finalmente, se ha demostrado que la sobrenutrición materna induce un aumento de la adiposidad, intolerancia a la glucosa y una alteración de los neurotransmisores reguladores del apetito a nivel del sistema nervioso central en la descendencia [32]. La mayoría de estos parámetros son criterios diagnósticos de síndrome metabólico, que se ven amplificados con una dieta postnatal alta en grasa.

El estado nutricional y metabólico de la madre durante la gestación desempeña un rol fundamental en la función reproductiva de la descendencia. Diversos estudios epidemiológicos han relacionado alteraciones nutricionales de la madre con un incremento del riesgo de ovario poliquístico [33-35], cáncer de mama [33, 36] y cáncer de ovario [37] en la descendencia. En modelos animales, ratas hijas de madres alimentadas con una dieta alta en grasa durante la preñez y la lactancia presentan una maduración sexual temprana o inicio anticipado de la pubertad [38-40]. Esta evidencia concuerda con un estudio retrospectivo realizado en humanos, el cual estableció una relación inversa entre el IMC de las madres antes del embarazo y la edad de la menarquía de sus hijas. Particularmente, se vio un aumento de la probabilidad de presentar la menarquía antes de los 12 años de edad en las hijas de madres con alto IMC durante el embarazo [41]. Recientemente nuestro laboratorio ha demostrado importantes cambios en la foliculogénesis ovárica en ratas hijas de madres sometidas a una dieta alta en grasa durante la gestación; entre ellos, se observó un menor desarrollo folicular y presencia de quistes ováricos [38]. Además, otros autores han demostrado que existe una alteración de la ciclicidad estral manifestada en estros y proestros persistentes en ratas hijas de madres obesas [39, 40]. Recientemente, otro grupo

demostró en ratones que madres gestantes alimentadas con una dieta alta en grasa, previo y durante la gestación, disminuye el desarrollo folicular ovárico en la descendencia [42].

Por otro lado, el modelo de obesidad durante la gestación inducido por dieta, presenta efectos similares al modelo de estrogenización neonatal. Por ejemplo, existe un conocido vínculo entre la exposición temprana a estradiol (E_2) o compuestos estrogénicos y el desarrollo de una pubertad precoz [43-45]. También se ha observado un desarrollo folicular alterado y presencia de ovario poliquístico en la adultez en ratas expuestas a altas concentraciones de E_2 durante el desarrollo [44-46]. Por otra parte, las alteraciones foliculares observadas en ratas hijas de madres obesas se acompañan de una disminución en la testosterona sérica y un incremento en el E_2 sérico [38]. De esta forma, el hecho de que ratas hijas de madres obesas presenten niveles elevados de E_2 resulta muy interesante, y permite pensar que el E_2 posee un posible rol como mediador de las alteraciones reproductivas observadas en la descendencia de madres obesas durante la gestación. En este trabajo, proponemos que este incremento de E_2 plasmático se debe a un incremento de los niveles de la enzima *cyp19* (aromatasa), limitante en la síntesis de E_2 [47]. Como parte de esta investigación, pretendemos demostrar que el incremento de E_2 y la disminución de testosterona en ratas adultas hijas de madres obesas se deben a un aumento de la expresión de aromatasa. La rata es un buen modelo experimental ya que su ciclo vital es mucho más corto que el de los humanos, lo que permite un seguimiento a largo plazo en un menor tiempo. A los 30 días de edad las ratas ya están próximas a la llegada a la pubertad y los niveles de estradiol más altos en esta edad pueden determinar la llegada adelantada de la

pubertad. A los 60 días de edad las ratas son adultas y ya han tenido al menos 4 ciclos estrales presentando una madurez del eje hipotálamo hipófisis ovario.

La enzima aromatasa se expresa principalmente en tejido ovárico, pero también se encuentra en otros tejidos como cerebro y tejido adiposo. Independiente de esto, la principal fuente de estrógenos en la hembra es el ovario, y durante el embarazo la placenta. En el ovario, se encuentran las estructuras que alojan al ovocito, las que se conocen como los folículos ováricos. Los folículos son estructuras formadas por células de la teca en su exterior, y células de la granulosa en el interior, las cuales se encuentran en contacto directo con el ovocito. Particularmente, la enzima aromatasa se expresa en las células de granulosa de los folículos ováricos, y sintetiza los estrógenos a partir de andrógenos provenientes de las células de la teca u otra fuente, como la glándula adrenal [48]. Al respecto, se ha demostrado en varios modelos experimentales que la administración de agentes estrogénicos durante el desarrollo induce un aumento en la expresión de la enzima aromatasa en ovario y distintos tejidos durante la adultez [49-51]. Considerando esto, una mayor producción de estrógenos a nivel ovárico podría explicar alteraciones como la pubertad adelantada y un menor desarrollo folicular, que se observan en ratas hijas de madres obesas tratadas con una dieta alta en grasa [38].

De acuerdo a estos antecedentes, creemos que la obesidad durante la gestación y la lactancia pueden incrementar la expresión de la enzima aromatasa en la descendencia, lo que podría llevar a un incremento en la síntesis y secreción de E_2 durante el desarrollo.

Hipótesis

La obesidad inducida por una dieta alta en grasa previo y durante la gestación y lactancia incrementa la expresión ovárica de aromatasa y la secreción ovárica de estradiol en ratas prepúberes y adultas descendientes.

Objetivos

Objetivo General

- Determinar la expresión ovárica de *cyp19* y la capacidad ovárica de secreción de estradiol en ratas de 30 y 60 días descendientes de madres obesas en comparación con ratas controles.

Objetivos Específicos

- Evaluar diferencias en el peso corporal a los 30 y 60 días en ratas hijas de madres alimentadas con una dieta alta en grasa, comparado con ratas hijas de madres alimentadas con una dieta control.
- Cuantificar la expresión de *cyp19* en ovario de ratas hijas de madres alimentadas con una dieta alta grasa, comparado con ratas hijas de madres alimentadas con una dieta control, al día postnatal 60.
- Determinar la capacidad ovárica de secreción de estradiol *ex-vivo* en ratas hijas de madres alimentadas con una dieta alta grasa, comparado con ratas hijas de madres alimentadas con una dieta control, al día postnatal 30.

Metodología

1. Diseño experimental

Animales:

Ratas de 200-250 g de peso de la cepa Sprague Dawley fueron alimentadas con una dieta control (Dieta Champion: 23% Proteína, 64% Hidratos de Carbono, 13% Lípidos, equivalentes a 349 Kcal/100g) o con una dieta alta en grasa (High Fat: HF, Research Diet™ USA; 20% Proteína, 20% Hidratos de Carbono y 60% Lípidos, equivalentes a 524 Kcal/100g). El grupo de ratas tratadas con dieta HF fueron alimentadas con dicha dieta por 30 días y luego se cruzaron con machos reproductores. La preñez se confirmó por la presencia de espermatozoides en el frotis vaginal. Estas ratas continuaron siendo alimentadas con dieta HF durante la preñez y lactancia. Las ratas controles se mantuvieron con comida control durante todo el periodo de estudio. Las determinaciones se realizaron en las ratas hijas de madres obesas a los 30 días y 60 días de edad (Figura 1).

***Serie experimental 1*:** En esta serie experimental se utilizaron muestras de ovarios de ratas de 60 días obtenidas en la tesis de Valery Ambrosetti y Marcelo Guerra, las cuales fueron almacenadas a -80 °C [38] (Figura 1). En esta tesis se utilizaron muestras de ratas hijas de madres obesas (n=6) o controles (n=10). Los niveles de E_2 de ratas adultas mostrados en esta tesis corresponden a determinaciones realizadas por Valery Ambrosetti y Marcelo Guerra [38].

***Serie experimental 2*:** Utilizando el mismo diseño experimental del modelo anterior se usaron muestras de ovarios de ratas hijas de madres obesas (n=7) o controles (n=6) con la diferencia que la eutanasia se realizó a los 30 días de edad (Figura 1).

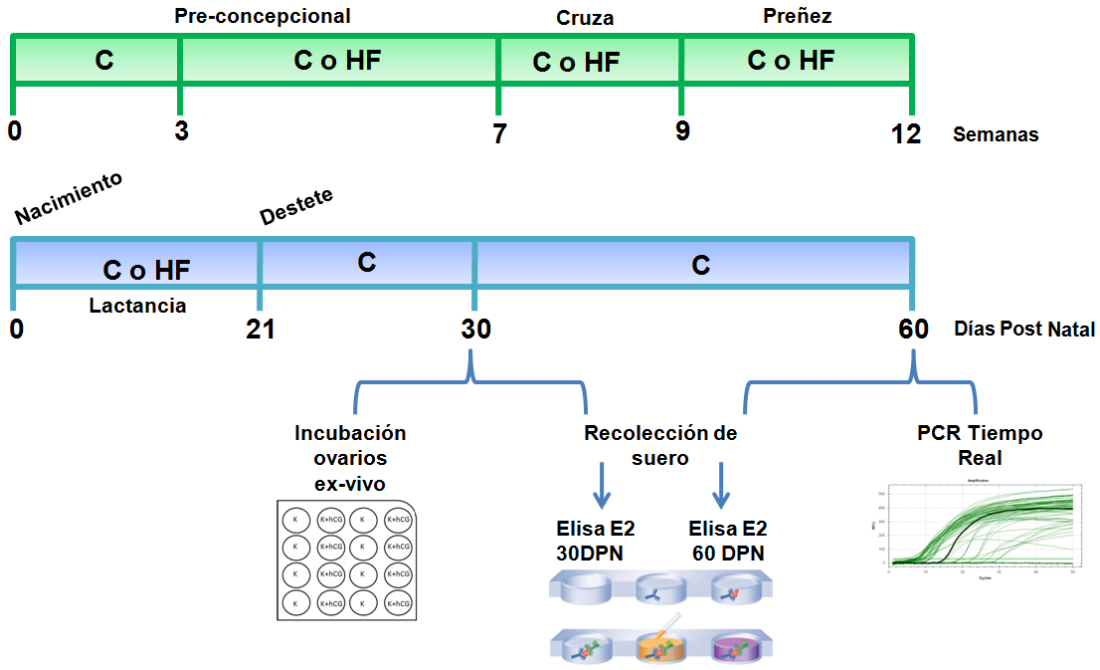

Figura 1. Diseño experimental de las ratas madres (verde) y de la descendencia (celeste). El peso corporal y la ciclicidad estral de las ratas fueron controladas dos semanas previas al experimento. Luego de esas dos semanas, un grupo de ratas se alimentó con dieta alta en grasa y otro grupo con la dieta de control durante un mes. Posteriormente, las ratas se cruzaron y se mantuvo la dieta de cada grupo durante la preñez y la lactancia. La descendencia recibió una dieta control después del destete. Las muestras y los tejidos se recogieron al día postnatal 30 (pre-púberes) y al día postnatal 60 (adultez).

Los animales permanecieron en el bioterio de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso durante todo el procedimiento experimental. Todos los animales se mantuvieron con acceso a comida y agua *ad libitum*, en una sala con temperatura controlada y con un ciclo controlado de 12h luz: 12h oscuridad.

Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el comité de Bioética de la Universidad de Valparaíso y el comité de Bioética de la Comisión Nacional de Investigación, Ciencia y Tecnología (CONICYT).

2. Control de peso

Se tomó registro diario del peso de las ratas madres durante 4 semanas previo a la cruza, durante la gestación y lactancia. Las crías fueron pesadas diariamente desde su nacimiento hasta el día posnatal 60 para la serie experimental 1, y hasta el día postnatal 30 para la serie experimental 2.

3. Incubación de ovarios ex-vivo

Los ovarios izquierdos de 13 ratas controles (n=6) e hijas de madres obesas (n=7) de 30 días de edad fueron incubados en 2 ml de medio Krebs bicarbonato-albúmina pH 7.4 (NaCl 118,6 mM, KCl 4,7 mM, KH2PO4 1,2 mM, MgSO4 1,2 mM, NaHCO3 25 mM, CaCl2 2,5 mM, glucosa 25 mM, ácido ascórbico 0,6 mM, EDTA 0,15 mM y albúmina 0,1 g/L) por 3 horas, con el objetivo de medir la liberación basal de E_2. Además, los ovarios derechos se incubaron con gonadotrofina coriónica humana (hCG) por 3 horas (2,5 UI/2mL, Sigma). La incubación se realizó en presencia de una mezcla O_2/CO_2 (95%/5%). Los niveles de secreción de E_2 basal y estimulados con hCG durante 3 horas se determinaron por ELISA competitivo.

4. Determinación de los niveles séricos de estradiol por Inmuno-ensayo ligado a enzima (ELISA)

La concentración de E_2 en el suero y en los medios de incubación se determinó a las crías hembras de la serie experimental 2 (30 días de edad). Los niveles de E_2 se determinaron por ELISA de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Alpco Diagnostic, USA). Los niveles de E_2 de ratas de 60 días de vida fueron determinados por Valery Ambrosetti y Marcelo

Guerra [38] previamente. La sensibilidad del ELISA fue de 10 pg/ml y la especificidad para E_2 fue de un 100% con una reactividad cruzada de 1,6% con estriol, 1,3% con estrona y menor al 0,1% con otras hormonas esteroidales.

5. Expresión de cyp19 por PCR en tiempo real

La extracción de ARN total se realizó con el kit RNeasy® Mini Kit (QUIAGEN, Cat. No. 74104). Para la transcripción reversa se utilizó la enzima SuperScript II (In Vitro gen, Cat. 18064-014), buffer provisto por el fabricante, desoxinucleotidos, random primers (In Vitro gen, Cat. 48190-011) e inhibidor de RNAasa (RNase OUT, In Vitro gen, Cat. 10777-019). El cDNA obtenido de la transcripción reversa fue amplificado por PCR en tiempo real utilizando los siguientes primers para *cyp19*: Forward: 5' – GCA CGA GAA TGG CAT CAT – 3' y Reverse: 5' – GTT AGA AGT GTC CAG CAT G – 3'. Se realizó una curva estándar de calibrado en la cual el Ct es inversamente proporcional a la concentración del producto amplificado. Los datos fueron normalizados por el gen constitutivo 18s cuyos primers son: Forward: 5' – TCA AGA ACG AAA GTC GGA GG – 3' y Reverse: 5' – GGA CAT CTA AGG GCA TCA CA – 3'.

6. Análisis Estadístico

6.1 Expresión de los resultados y test estadístico

Los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prism® versión 6.0. Los resultados fueron expresados como el promedio ± el error estándar medio (EEM). Se utilizó el error estándar medio debido a que no todos los grupos tienen el mismo número de muestras, y esta representación considera el "n" de cada grupo. Las comparaciones entre los grupos

control y HF fueron realizadas mediante la prueba de comparación de media T-student. Para la comparación de control y HF en 2 condiciones experimentales (Basal y hCG) se utilizó la prueba Two-way ANOVA. Se estableció los niveles de significancia de la siguiente forma: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$ para indicar diferencias estadísticamente significativas. Debido a lo evidenciado en la literatura, las variables determinadas en esta tesis siguen una distribución paramétrica, por lo que se asumió una distribución normal de los datos.

6.2 Elección del número de muestra

En los estudios en animales de experimentación debe existir un equilibrio entre el aspecto estadístico y el bioético para determinar el número de muestra adecuado, considerando que todos los animales son sometidos a eutanasia al final del estudio. Los animales de experimentación presentan una variabilidad muy baja con respecto al humano, ya que se encuentran en condiciones controladas, por lo que un "n" entre 4 y 8 animales por grupo es un valor adecuado, según lo evidenciado en distintos trabajos publicados en el área [28, 30, 40, 45, 52]. Sin embargo, en esta tesis el "n" también depende de la cantidad de crías que tienen las madres, ya que se hacen los análisis con la descendencia.

Resultados

A continuación se presenta una caracterización del modelo de obesidad gestacional y su impacto sobre la descendencia. Posteriormente, se describen los parámetros analizados en este trabajo.

1. **Evaluación de peso corporal en ratas descendientes de madres obesas comparadas con controles a los 30 y 60 días de edad**

La diferencia de peso corporal comienza a ser significativa en ratas pre-púberes de 30 días, etapa previa a la apertura vaginal en ratas hembras. Las crías de madres alimentadas con una dieta alta en grasa pesaron significativamente más que las crías de madres controles (Fig.2, $p<0.0001$; 70,13 ± 2,264 n=16 grupo control vs 86,69 ± 2,490 n=16 grupo HF), al día postnatal 30. Ambas series experimentales fueron alimentadas con dieta control luego del destete.

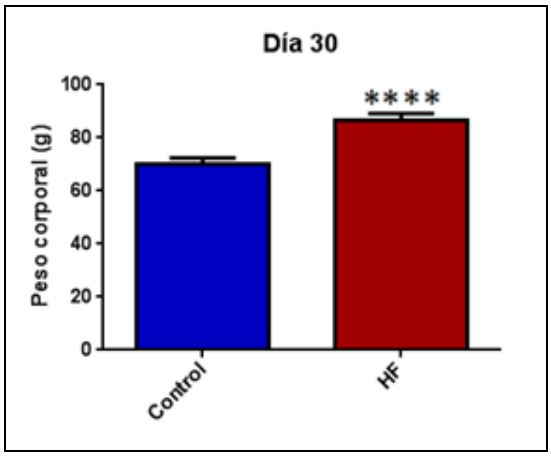

Figura 2. Peso corporal al día postnatal 30. La figura presenta el peso corporal en gramos de ratas machos y hembras pre-púberes al día 30 de edad. Los resultados se expresan como el promedio ± EEM. Grupo control n=16; Grupo HF n=16. **** $p<0.0001$ vs Control.

Como se observa en la Fig.3 el peso corporal en ratas hembras y machos fue significativamente mayor en las ratas hijas de madres alimentadas con una dieta alta en grasa en comparación con las ratas hijas de madres alimentadas con una dieta control al día 30 postnatal (Fig. 3A. $p<0.01$; 70,88 ± 3,136 n=8 grupo control vs 89,00 ± 3,640 n=9 grupo HF; Fig. 3B. $p<0.01$ 69,38 ± 3,459 n=8 grupo control vs 83,71 ± 3,175 n=7 grupo HF). Esto indica que no existen diferencias por sexo en la ganancia de peso durante la etapa pre-puberal.

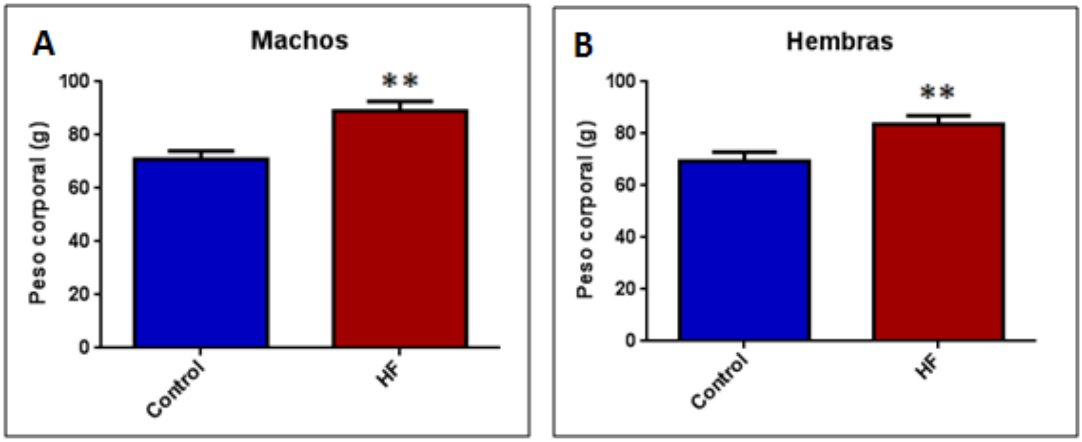

Figura 3. (A) Peso corporal en gramos de ratas machos pre-púberes al día 30 de edad. Grupo control n=8; Grupo HF n=9 **(B) Peso corporal en gramos de ratas hembras pre-púberes al día 30 de edad.** Grupo control n=8; Grupo HF n=7. Los resultados se expresan como el promedio ± EEM. ** $p<0.01$ vs Control.

Las ratas adultas de 60 días de edad también presentaron diferencias de peso en ambos sexos. Como se observa en la Fig.4A ratas machos hijos de madres alimentadas con una dieta alta en grasa pesaron significativamente más que las ratas machos hijos de madres controles ($p<0.05$; 239,1 ± 2,371 n=16 grupo control vs 288,8 ± 4,750 n=12 n=9 grupo HF). Resultado que se repitió en ratas hembras de 60 días de edad (Fig. 4B $p<0.0001$; 173,9 ± 4,055 n=16 grupo control vs 199,8 ± 3,482 n=12 grupo HF). Por lo tanto la ganancia de

peso corporal de las ratas se mantiene hasta la adultez, independiente del sexo. Pero este aumento es más significativo en las ratas hembras (p<0,0001) que en los machos (p<0,05).

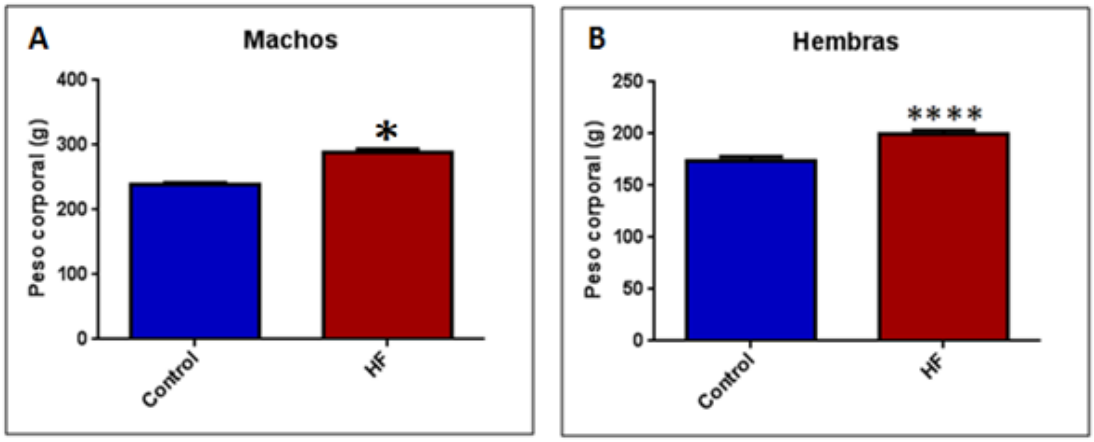

Figura 4. (A) Peso corporal de ratas machos al día 60 de edad. Grupo control n=16; Grupo HF n=12 **(B) Peso corporal ratas hembras al día 60 de edad.** Grupo control n=16; Grupo HF n=12. Los resultados se expresan como el promedio ± EEM. * p<0,05 vs Control. **** p<0.0001 vs Control.

2. Niveles sérico de estradiol en ratas descendientes de madres obesas comparadas con controles a los 30 y 60 días de edad

Se determinaron los niveles de E_2 sérico al día postnatal 60 (Fig.5) y se encontró un aumento de la concentración sérica para el grupo HF en comparación con el control (p<0.05; 81.59 ± 2.397 n=7 grupo control vs 93.97 ± 7.854 n=4 grupo HF).

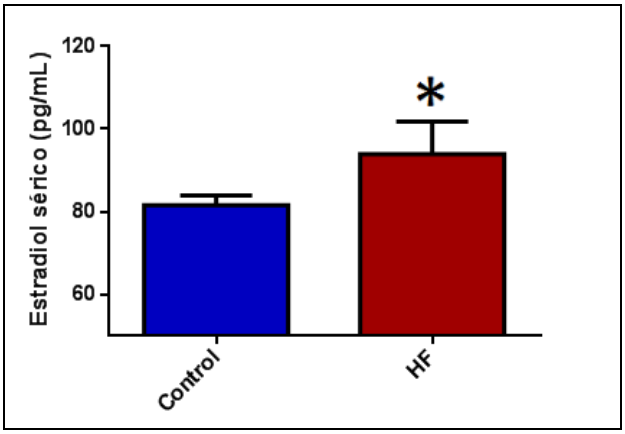

Figura 5. Niveles séricos de estradiol en ratas adultas al día postnatal 60. El gráfico representa la concentración de estradiol sérico (pg/ml) en ratas adultas hijas de madres controles comparado con hijas de madres obesas. Los resultados se expresan como el promedio ± EEM. Grupo control n=7; Grupo HF n=4. * p<0.05 vs Control.

Para observar si el aumento de E_2 en la descendencia ocurría antes de la pubertad, se determinaron los niveles de E_2 sérico en ratas pre-púberes de 30 día de edad (Fig. 6) y se encontró un aumento de esta hormona en el grupo HF (p<0.01; 180,0 ± 25,17 n=4 grupo control vs 254,7 ± 7,158 n=8 grupo HF) comparado con el grupo control. Resultados que concuerdan con los niveles de hormonas sexuales obtenidos a los 60 días de edad.

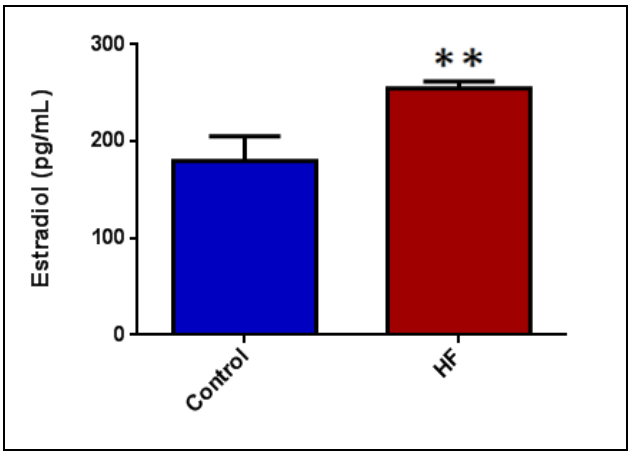

Figura 6. Niveles séricos de estradiol en ratas pre-púber al día postnatal 30. El gráfico representa la concentración de estradiol sérico (pg/ml) en ratas pre-púberes hijas de madres controles comparado con hijas de madres obesas. Los resultados se expresan como el promedio ± EEM. Grupo control n=4; Grupo HF n=8. ** p<0.01 vs Control.

3. Niveles de RNAm de aromatasa en ratas descendientes de madres obesas comparadas con controles a los 30 días de edad

En nuestro laboratorio se ha observado que ratas hijas de madres obesas tienen una disminución en la testosterona sérica y un incremento en el E_2 sérico al día postnatal 60, comparado con controles de la misma edad [38]. Dado que la testosterona es transformada a E_2 por la enzima aromatasa (*cyp 19*), se determinaron los niveles de ARNm de *cyp 19* en ovario de ratas hijas de madres alimentadas con una dieta alta en grasa, comparado con ratas hijas de madres alimentadas con una dieta control, como un reflejo de la expresión de dicha enzima en el ovario. Los resultados muestran que no existen cambios en los niveles de ARNm de *cyp 19* en ratas hijas de madres obesas comparado con ratas hijas de madres controles a los 60 días de edad. (Fig. 7; n=10 grupo control vs n=6 grupo HF).

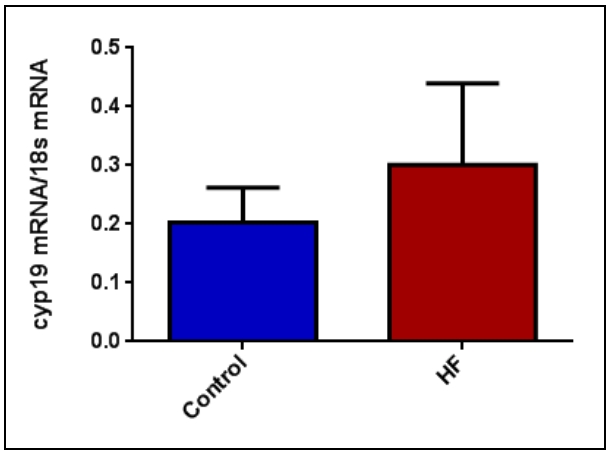

Figura 7. Expresión de *cyp19* en ovario de ratas al día postnatal 60. Se observan los niveles del ARNm de la enzima aromatasa normalizado por el gen constitutivo 18s en el ovario de ratas de 60 días de edad. No se observan diferencias significativas entre hijas de madres controles e hijas de madres tratadas. Los resultados se expresan como el promedio ± EEM. Grupo control n=10; Grupo HF n=6.

4. Secreción ovárica de estradiol en ratas descendientes de madres obesas comparadas con controles a los 30 días de edad

Para determinar si este aumento de E_2 provenía de una mayor síntesis ovárica, se evaluó la secreción ovárica de E_2 en ratas hijas de madres obesas comparado con hijas de madres controles a los 30 días de edad (Fig. 8; n=4 grupo control vs n=8 grupo HF). Las ratas descendientes de madres alimentadas con una dieta alta en grasa que no fueron estimuladas con hCG no tuvieron una mayor síntesis ovárica de E2 en comparación con las ratas hijas de madres controles basales. Por otro lado, las ratas hijas de madres alimentadas con una dieta control, que fueron estimuladas con hCG, presentaron una mayor secreción de E2 en comparación con el grupo control que no fue estimulado ($p<0,001$). Lo mismo ocurrió con las ratas hijas de madres con obesidad gestacional, el grupo HF estimulado tuvo una secreción mayor de E2 que el grupo HF basal ($p<0,05$). Sin embargo, las ratas descendientes de madres alimentadas con una dieta alta en grasa que fueron estimuladas no tuvieron una mayor síntesis ovárica de E2 en comparación con las ratas hijas de madres controles estimuladas.

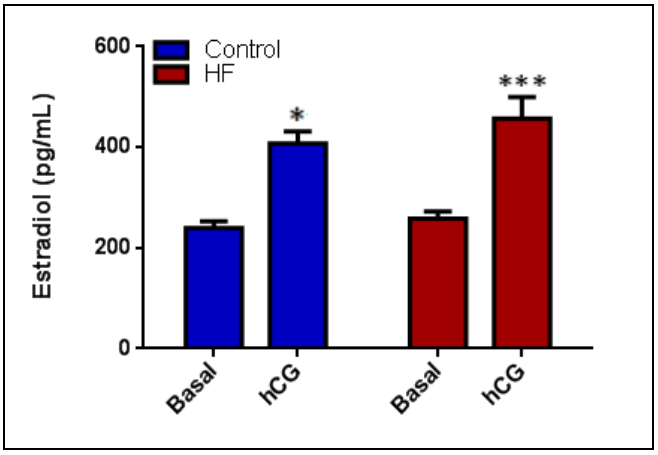

Figura 8. Secreción ovárica de estradiol en ratas pre-púber al día postnatal 30. La figura muestra los niveles basales de estradiol (pg/ml) y post-estimulo con hCG en un medio de incubación. No se observan diferencias significativas entre hijas de madres controles e hijas de madres tratadas. Los resultados se expresan como el promedio ± EEM. Grupo control n=4; Grupo HF n=8. * $p<0.05$ vs Control Basal. *** $p<0.001$ vs HF Basal.

Discusión

La obesidad gestacional es un problema de salud que se ha incrementado durante las últimas décadas, y que tiene un gran impacto sobre la salud de las futuras generaciones. El estudio sobre un vínculo entre la alimentación junto con el estado nutricional de la madre, y el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles de la descendencia en su etapa adulta adquiere relevancia en la actualidad. En esta tesis las alteraciones metabólicas y reproductivas ampliamente descritas en la literatura, han sido reproducidas en el modelo experimental utilizado, y además complementadas con nuevos antecedentes por nuestro grupo. Es importante destacar que estas alteraciones se mantienen en la descendencia independiente del tipo de dieta que posean. Dado lo anterior, el impacto de la alimentación de la madre sobre el desarrollo del feto se perpetúa hasta la pubertad y la adultez de la descendencia.

En el presente estudio las ratas del grupo HF (Ratas hijas de madres sometidas a una alimentación con dieta con un 60% de las calorías en contenido graso) tuvieron una mayor ganancia de peso durante el desarrollo posnatal al compararlas con ratas controles (Ratas hijas de madres sometidas a una alimentación con dieta con un 12% de las calorías en contenido graso). Estos resultados concuerdan con las evidencias obtenidas por otros autores en modelos experimentales similares [25, 39, 53]. El incremento en el peso fue significativo en la etapa pre-puberal (día 30 postnatal) y se mantuvo hasta la adultez (día 60 postnatal). Los resultados descritos se relacionan con evidencias de otros grupos, en donde la ganancia de peso del grupo HF se asocia con una tendencia a una mayor ingesta

alimentaria durante el desarrollo posnatal en ratas HF [38]. Incluso, se ha evaluado la ingesta durante el periodo de lactancia (previo al día posnatal 21), mostrando que ratas hijas de madres obesas ya presentan una ingesta superior [54]. Kirk y cols, describe que en el día postnatal 30, la leptina sérica es normal en ratas hijas de madres obesas, sin embargo se produce una resistencia a esta hormona que atenúa la supresión del apetito en el núcleo arcuato (ARC) del hipotálamo, efecto inducidos por la leptina. Además, ratas adultas presentaron niveles elevados de leptina sérica y una resistencia a esta hormona [52]. Otros factores orexígenos y anorexígenos que controlan el apetito y el gasto energético pueden estar alterados en la descendencia de madres con obesidad gestacional. Se ha examinado la región hipotalámica del cerebro de ratas hijas de madres con obesidad gestacional, donde la señalización de neuropéptidos orexígenos se encuentra aumentada y la señalización de neuropéptidos anorexígenos disminuida [55]. Estos efectos pueden ser la base de la programación del desarrollo de la hiperfagia y la obesidad en ratas hijas de madres con obesidad gestacional.

Además de las alteraciones metabólicas ya descritas, nuestro grupo y otros han evidenciado alteraciones en la llegada de la pubertad, ciclicidad estral y desarrollo folicular en ratas HF [38, 39, 42]. En nuestro laboratorio se ha medido el perfil sérico de hormonas sexuales en ratas adultas (60 días de edad) en la etapa estro, en donde se observó que ratas HF tienen niveles bajos de testosterona y niveles elevados de E_2 sérico. Además, resultados de esta tesis y otra realizada en paralelo [56] demuestran que el aumento de E_2 ocurre desde antes de la pubertad. Una explicación de este aumento de E_2 plasmático permanente en la descendencia se puede deber a un incremento en su síntesis ovárica a través de la enzima

aromatasa (*cyp19)* [49-51]. En la presente tesis observamos que no hay variaciones en los niveles del ARNm de este gen en ratas de 60 días descendientes de madres obesas comparadas con controles, lo que descartaría una alteración de la expresión génica de *cyp19.* Aun así, es necesario en un futuro cuantificar la concentración de la proteína CYP19 o evaluar su actividad para obtener resultados más concluyentes. Desafortunadamente, estas evaluaciones requieren una gran cantidad de proteína obtenida desde el tejido, siendo una limitante que no nos permitió realizar estas determinaciones en este trabajo. Sin embargo, para poder determinar si el incremento de E_2 plasmático se debe a una mayor síntesis ovárica realizamos un experimento funcional de secreción *in vitro* de E_2. En este experimento se midió la capacidad ovárica de secreción basal, y post estímulo con hCG, de E_2. En la rata hembra el ovario es la principal fuente de E_2, y su secreción depende de una gran cantidad de factores como la expresión de la enzima aromatasa, la etapa de desarrollo, la respuesta a las gonadotropinas y la cantidad de folículos ováricos que producen E_2, entre otras. En este experimento tanto los ovarios de ratas controles como HF responden adecuadamente a la estimulación con hCG, sin embargo, no se encontraron variaciones entre ratas hijas de madres obesas y controles. Esto puede sugerir que el aumento de estradiol observado no es de origen ovárico. Otras alternativas que pueden explicar el aumento de estradiol sérico son una mayor síntesis de éste en otros tejidos o una menor metabolización de la hormona [56].

En resumen, las ratas hijas de madres alimentadas con una dieta alta en grasa presentaron una mayor concentración de E_2 plasmático en comparación con ratas controles al día 30 y 60 postnatal. Este resultado nos permite evidenciar un aumento de E_2 plasmático

significativo incluso previo a la pubertad, lo cual puede ser el causal de las alteraciones reproductivas como la pubertad precoz o las alteraciones foliculares. Sin embargo, una mayor aromatización ovárica de testosterona a E_2 no parece ser la causal del aumento de E_2 y la disminución de testosterona sérica en ratas hijas de madres obesas, lo que deja ver otras posibilidades. Por ejemplo, la aromatasa es un enzima cuya principal acción ocurre a nivel ovárico, sin embargo, no es el único tejido donde se expresa. Esta afirmación permite suponer que los cambios hormonales descritos en este trabajo, pueden ser producto de una aromatización de testosterona a E_2 en otros tejidos periféricos. Al respecto, es importante recordar que las ratas descendientes de madres obesas tienen una mayor acumulación de tejido adiposo [27, 57, 58], lo que nosotros vemos reflejado en el aumento de peso de las ratas descendientes de madres obesas, la cual es significativa incluso desde su nacimiento [38, 59, 60]. Por lo tanto, es posible que exista una mayor aromatización de testosterona a E_2 en tejido graso que dé cuenta del aumento sérico de esta hormona [61]. La relación entre la aromatasa y el tejido adiposo se destacó por primera vez en la década de 1970 cuando Edman y MacDonald [62, 63] observaron una correlación entre la actividad de la aromatasa y el peso corporal en mujeres pre y postmenopáusicas.

Es importante destacar que hemos demostrado que existe una mayor concentración sérica de E_2 días antes de la llegada de la pubertad en ratas HF, evidencia que no ha sido documentada. En un futuro cercano y como continuación de este trabajo, será importante medir la expresión de *cyp19* en tejido adiposo y además analizar los niveles y/o actividad de la proteína aromatasa por inmunohistoquímica o westernblot. Como una proyección a largo plazo de este trabajo, es de gran importancia realizar intervenciones nutricionales o

farmacológicas en este modelo experimental, con el fin de prevenir o revertir las alteraciones que hemos caracterizado.

Finalmente, como se ha descrito a lo largo de este trabajo, la obesidad materna y el exceso de nutrientes entregado al feto contribuyen a la obesidad y los trastornos metabólicos en la descendencia. El embarazo ofrece la oportunidad de modificar el ambiente intrauterino, a través de los cambios de estilo de vida materno, previo y durante la gestación, que pueden conferir beneficios para la salud del niño. Recientemente, un estudio mostró que mujeres embarazadas chilenas tienen una alta ingesta de lípidos, principalmente ácidos grasos saturados [64], adquiriendo relevancia las estrategias de promoción de la salud, a través de la nutrición, previo y durante la gestación. Dentro de los programas de salud presentes en Chile, sería importante que el Programa Nacional de Salud de la Mujer fomente la relevancia de la nutrición de la embarazada sobre la salud y la calidad de vida que tendrá el gestante en su etapa adulta. La prevención de enfermedades crónicas no transmisibles de las futuras generaciones puede comenzar durante su gestación, por medio de políticas de salud pública que generen conciencia en la población femenina en edad fértil y logren cambios en sus hábitos alimentarios.

Conclusiones

1) La obesidad materna durante la gestación y lactancia genera un aumento en el peso en la descendencia independiente de la alimentación que ésta tenga a lo largo de su vida.

2) Ratas hijas de madres obesas no presentaron variaciones en la expresión de *cyp19* en ovario comparado con ratas hijas de madres alimentadas con una dieta control en la etapa adulta. Es posible que exista una mayor aromatización de testosterona a E_2 en otros tejidos periféricos, como el tejido graso.

3) La capacidad ovárica de secreción de estradiol *ex-vivo* no se encuentra aumentada en ratas hijas de madres alimentadas con una dieta alta grasa, lo que no explica el aumento sérico de estradiol y la pubertad adelanta en ratas pre-púberes.

Referencias

1. Malik VS, Willett WC, Hu FB. Global obesity: trends, risk factors and policy implications. Nature reviews Endocrinology. 2013 Jan;9(1):13-27.
2. OMS. Obesidad y Sobrepeso. 2014 [cited 2014 2014-05-26]; Available from: http://www.who.int/about/copyright/es/
3. Ogden CL, Carroll MD, Kit BK, Flegal KM. Prevalence of obesity among adults: United States, 2011-2012. NCHS data brief. 2013 Oct(131):1-8.
4. MINSAL. Encuesta Nacional de Salud, Chile. 2009-2010:29.
5. INTA UdC. El preocupante incremento de la obesidad infantil en chile. 2013 [cited 2014 2014-05-26]; Available from: http://www.inta.cl/index.php?option=com_content&view=article&id=502:obesidad-infantil&catid=53:opinion&Itemid=134
6. Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ, et al. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. Lancet. 2011 Feb 12;377(9765):557-67.
7. Grundy SM. What is the contribution of obesity to the metabolic syndrome? Endocrinology and metabolism clinics of North America. 2004 Jun;33(2):267-82, table of contents.
8. Bray GA. Medical consequences of obesity. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2004 Jun;89(6):2583-9.
9. MINSAL. Situación epidemiológica de las ECNT en Chile. 2011:79.

10. Atalah E. Epidemiology of obesity in Chile. Rev Med Clin Condes. 2012;23(2):117-23.

11. Cedergren MI. Maternal morbid obesity and the risk of adverse pregnancy outcome. Obstetrics and gynecology. 2004 Feb;103(2):219-24.

12. Smith GC, Shah I, Pell JP, Crossley JA, Dobbie R. Maternal obesity in early pregnancy and risk of spontaneous and elective preterm deliveries: a retrospective cohort study. American journal of public health. 2007 Jan;97(1):157-62.

13. Weiss JL, Malone FD, Emig D, Ball RH, Nyberg DA, Comstock CH, et al. Obesity, obstetric complications and cesarean delivery rate--a population-based screening study. American journal of obstetrics and gynecology. 2004 Apr;190(4):1091-7.

14. Catalano PM, Ehrenberg HM. The short- and long-term implications of maternal obesity on the mother and her offspring. BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology. 2006 Oct;113(10):1126-33.

15. Lashen H, Fear K, Sturdee DW. Obesity is associated with increased risk of first trimester and recurrent miscarriage: matched case-control study. Human reproduction. 2004 Jul;19(7):1644-6.

16. Metwally M, Li TC, Ledger WL. The impact of obesity on female reproductive function. Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity. 2007 Nov;8(6):515-23.

17. Lucas A. Programming by early nutrition in man. Ciba Foundation symposium. 1991;156:38-50; discussion -5.

18. Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. Lancet. 1989 Sep 9;2(8663):577-80.

19. Barker DJ. In utero programming of chronic disease. Clinical science. 1998 Aug;95(2):115-28.

20. Sen S, Carpenter AH, Hochstadt J, Huddleston JY, Kustanovich V, Reynolds AA, et al. Nutrition, weight gain and eating behavior in pregnancy: a review of experimental evidence for long-term effects on the risk of obesity in offspring. Physiology & behavior. 2012 Aug 20;107(1):138-45.

21. Svensson V, Jacobsson JA, Fredriksson R, Danielsson P, Sobko T, Schioth HB, et al. Associations between severity of obesity in childhood and adolescence, obesity onset and parental BMI: a longitudinal cohort study. International journal of obesity. 2011 Jan;35(1):46-52.

22. Burke V, Beilin LJ, Dunbar D. Family lifestyle and parental body mass index as predictors of body mass index in Australian children: a longitudinal study. International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity. 2001 Feb;25(2):147-57.

23. Hochner H, Friedlander Y, Calderon-Margalit R, Meiner V, Sagy Y, Avgil-Tsadok M, et al. Associations of maternal prepregnancy body mass index and gestational weight gain with adult offspring cardiometabolic risk factors: the Jerusalem Perinatal Family Follow-up Study. Circulation. 2012 Mar 20;125(11):1381-9.

24. Li M, Sloboda DM, Vickers MH. Maternal obesity and developmental programming of metabolic disorders in offspring: evidence from animal models. Experimental diabetes research. 2011;2011:592408.

25. Howie GJ, Sloboda DM, Kamal T, Vickers MH. Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. The Journal of physiology. 2009 Feb 15;587(Pt 4):905-15.

26. Tamashiro KL, Terrillion CE, Hyun J, Koenig JI, Moran TH. Prenatal stress or high-fat diet increases susceptibility to diet-induced obesity in rat offspring. Diabetes. 2009 May;58(5):1116-25.

27. Samuelsson AM, Morris A, Igosheva N, Kirk SL, Pombo JM, Coen CW, et al. Evidence for sympathetic origins of hypertension in juvenile offspring of obese rats. Hypertension. 2010 Jan;55(1):76-82.

28. Liang C, Oest ME, Prater MR. Intrauterine exposure to high saturated fat diet elevates risk of adult-onset chronic diseases in C57BL/6 mice. Birth defects research Part B, Developmental and reproductive toxicology. 2009 Oct;86(5):377-84.

29. Bouanane S, Merzouk H, Benkalfat NB, Soulimane N, Merzouk SA, Gresti J, et al. Hepatic and very low-density lipoprotein fatty acids in obese offspring of overfed dams. Metabolism: clinical and experimental. 2010 Dec;59(12):1701-9.

30. Oben JA, Patel T, Mouralidarane A, Samuelsson AM, Matthews P, Pombo J, et al. Maternal obesity programmes offspring development of non-alcoholic fatty

pancreas disease. Biochemical and biophysical research communications. 2010 Mar 26;394(1):24-8.

31. Bayol SA, Simbi BH, Bertrand JA, Stickland NC. Offspring from mothers fed a 'junk food' diet in pregnancy and lactation exhibit exacerbated adiposity that is more pronounced in females. The Journal of physiology. 2008 Jul 1;586(13):3219-30.

32. Rajia S, Chen H, Morris MJ. Maternal overnutrition impacts offspring adiposity and brain appetite markers-modulation by postweaning diet. Journal of neuroendocrinology. 2010 Aug;22(8):905-14.

33. Davies MJ, Norman RJ. Programming and reproductive functioning. Trends in endocrinology and metabolism: TEM. 2002 Nov;13(9):386-92.

34. Cresswell JL, Barker DJ, Osmond C, Egger P, Phillips DI, Fraser RB. Fetal growth, length of gestation, and polycystic ovaries in adult life. Lancet. 1997 Oct 18;350(9085):1131-5.

35. Godfrey KM, Barker DJ. Fetal nutrition and adult disease. The American journal of clinical nutrition. 2000 May;71(5 Suppl):1344S-52S.

36. Hilakivi-Clarke L, Cho E, deAssis S, Olivo S, Ealley E, Bouker KB, et al. Maternal and prepubertal diet, mammary development and breast cancer risk. The Journal of nutrition. 2001 Jan;131(1):154S-7S.

37. Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Phillips DI, Sultan HY. Weight gain in infancy and cancer of the ovary. Lancet. 1995 Apr 29;345(8957):1087-8.

38. Ambrosetti V, Guerra M. Exposicion materna a una dieta alta en grasa previo y durante la preñez y lactancia, y sus consecuencias en la funcion reproductiva de la

descendencia [Tesis para optar al título de Nutricionista]: Facultad de Farmacia, Universidad de Valparaiso; 2013.

39. Connor KL, Vickers MH, Beltrand J, Meaney MJ, Sloboda DM. Nature, nurture or nutrition? Impact of maternal nutrition on maternal care, offspring development and reproductive function. The Journal of physiology. 2012 May 1;590(Pt 9):2167-80.

40. Sloboda DM, Howie GJ, Pleasants A, Gluckman PD, Vickers MH. Pre- and postnatal nutritional histories influence reproductive maturation and ovarian function in the rat. PloS one. 2009;4(8):e6744.

41. Keim SA, Branum AM, Klebanoff MA, Zemel BS. Maternal body mass index and daughters' age at menarche. Epidemiology. 2009 Sep;20(5):677-81.

42. Cheong Y, Sadek KH, Bruce KD, Macklon N, Cagampang FR. Diet-induced maternal obesity alters ovarian morphology and gene expression in the adult mouse offspring. Fertility and sterility. 2014 Sep;102(3):899-907.

43. Ramirez VD, Sawyer CH. Advancement of Puberty in the Female Rat by Estrogen. Endocrinology. 1965 Jun;76:1158-68.

44. Sotomayor-Zarate R, Dorfman M, Paredes A, Lara HE. Neonatal exposure to estradiol valerate programs ovarian sympathetic innervation and follicular development in the adult rat. Biology of reproduction. 2008 Apr;78(4):673-80.

45. Cruz G, Barra R, Gonzalez D, Sotomayor-Zarate R, Lara HE. Temporal window in which exposure to estradiol permanently modifies ovarian function causing polycystic ovary morphology in rats. Fertility and sterility. 2012 Nov;98(5):1283-90.

46. Vickers MH, Sloboda DM. Prenatal nutritional influences on obesity risk in offspring. Nutrition and Dietary Supplements. 2010(2):137–49.

47. Yu AM, Fukamachi K, Krausz KW, Cheung C, Gonzalez FJ. Potential role for human cytochrome P450 3A4 in estradiol homeostasis. Endocrinology. 2005 Jul;146(7):2911-9.

48. Chang HM, Cheng JC, Klausen C, Taylor EL, Leung PC. Effects of Recombinant Activins on Steroidogenesis in Human Granulosa-Lutein Cells. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2014 Jul 25:jc20141223.

49. Kishida M, McLellan M, Miranda JA, Callard GV. Estrogen and xenoestrogens upregulate the brain aromatase isoform (P450aromB) and perturb markers of early development in zebrafish (Danio rerio). Comparative biochemistry and physiology Part B, Biochemistry & molecular biology. 2001 Jun;129(2-3):261-8.

50. Colciago A, Casati L, Mornati O, Vergoni AV, Santagostino A, Celotti F, et al. Chronic treatment with polychlorinated biphenyls (PCB) during pregnancy and lactation in the rat Part 2: Effects on reproductive parameters, on sex behavior, on memory retention and on hypothalamic expression of aromatase and 5alpha-reductases in the offspring. Toxicology and applied pharmacology. 2009 Aug 15;239(1):46-54.

51. Arase S, Ishii K, Igarashi K, Aisaki K, Yoshio Y, Matsushima A, et al. Endocrine disrupter bisphenol A increases in situ estrogen production in the mouse urogenital sinus. Biology of reproduction. 2011 Apr;84(4):734-42.

52. Kirk SL, Samuelsson AM, Argenton M, Dhonye H, Kalamatianos T, Poston L, et al. Maternal obesity induced by diet in rats permanently influences central processes regulating food intake in offspring. PloS one. 2009;4(6):e5870.

53. Ferezou-Viala J, Roy AF, Serougne C, Gripois D, Parquet M, Bailleux V, et al. Long-term consequences of maternal high-fat feeding on hypothalamic leptin sensitivity and diet-induced obesity in the offspring. American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology. 2007 Sep;293(3):R1056-62.

54. Purcell RH, Sun B, Pass LL, Power ML, Moran TH, Tamashiro KL. Maternal stress and high-fat diet effect on maternal behavior, milk composition, and pup ingestive behavior. Physiology & behavior. 2011 Sep 1;104(3):474-9.

55. Stachowiak EK, Srinivasan M, Stachowiak MK, Patel MS. Maternal obesity induced by a high fat diet causes altered cellular development in fetal brains suggestive of a predisposition of offspring to neurological disorders in later life. Metabolic brain disease. 2013 Dec;28(4):721-5.

56. Reyes A. Expresión de cyp3a en el hígado de ratas descendientes de madres con obesidad gestacional y su relación con los niveles séricos de estradiol [Tesis para optar al título de nutricionista]: Facultad de Farmacia, Universidad de Vaparaíso; 2014.

57. Chen H, Simar D, Lambert K, Mercier J, Morris MJ. Maternal and postnatal overnutrition differentially impact appetite regulators and fuel metabolism. Endocrinology. 2008 Nov;149(11):5348-56.

58. Shankar K, Harrell A, Liu X, Gilchrist JM, Ronis MJ, Badger TM. Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring. American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology. 2008 Feb;294(2):R528-38.

59. Strakovsky RS, Zhang X, Zhou D, Pan YX. Gestational high fat diet programs hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and histone modification in neonatal offspring rats. The Journal of physiology. 2011 Jun 1;589(Pt 11):2707-17.

60. Ashino NG, Saito KN, Souza FD, Nakutz FS, Roman EA, Velloso LA, et al. Maternal high-fat feeding through pregnancy and lactation predisposes mouse offspring to molecular insulin resistance and fatty liver. The Journal of nutritional biochemistry. 2012 Apr;23(4):341-8.

61. Tchernof A, Mansour MF, Pelletier M, Boulet MM, Nadeau M, Luu-The V. Updated survey of the steroid-converting enzymes in human adipose tissues. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology. 2014 Nov 14;147C:56-69.

62. Edman CD, MacDonald PC. Effect of obesity on conversion of plasma androstenedione to estrone in ovulatory and anovulator young women. American journal of obstetrics and gynecology. 1978 Feb 15;130(4):456-61.

63. MacDonald PC, Edman CD, Hemsell DL, Porter JC, Siiteri PK. Effect of obesity on conversion of plasma androstenedione to estrone in postmenopausal women with and without endometrial cancer. American journal of obstetrics and gynecology. 1978 Feb 15;130(4):448-55.

64. Bascunan KA, Valenzuela R, Chamorro R, Valencia A, Barrera C, Puigrredon C, et al. Polyunsaturated fatty acid composition of maternal diet and erythrocyte phospholipid status in Chilean pregnant women. Nutrients. 2014 Nov;6(11):4918-34.

Anexos

Anexo 1. Cumplimiento del cronograma de actividades de la Tesis de Grado.

Mes	Mayo				Junio				Julio				Agosto			
Semana	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Desarrollo Serie Experimental																
Desarrollo metodológico																
Expresión *cyp19*																
Análisis hormonal: Estradiol																
Incubación ovarios *ex-vivo*																
Análisis de Resultados																
Desarrollo de Tesis (Escrito)																
Entrega de Tesis																

Mes	Septiembre				Octubre				Noviembre				Diciembre			
Semana	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Desarrollo Serie Experimental													√			
Desarrollo metodológico														√		
Expresión *cyp19*					√											
Análisis hormonal: Estradiol								√								
Incubación ovarios *ex-vivo*														√		
Análisis de Resultados														√		
Desarrollo de Tesis (Escrito)														√		
Entrega de Tesis															√	