

**“SISTEMA ENDOCANABINOIDE Y SU ROL EN EL DESARROLLO DE ESTEATOSIS  
HEPÁTICA NO ALCOHOLICA EN LA DESCENDENCIA DE RATAS OBESAS”**

**Tesis para optar al grado de Licenciado en Nutrición y Dietética y al título de Nutricionista.**

**DANIELA ANDREA VIVANCO GATICA**

**Director: Gonzalo Cruz Neculpán**

2016



*Gracias a todos*

<b>RESUMEN.....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>8</b>
Prevalencia de obesidad en el mundo y Chile .....	8
Origen temprano de esteatosis hepática no alcohólica.....	9
Esteatosis hepatica no alcohólica.....	10
Sistema endocanabinoide.....	11
El sistema endocanabinoide y su relacion con la esteatosis hepatica. ....	14
<b>HIPOTESIS .....</b>	<b>17</b>
<b>OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>18</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>18</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS. ....</b>	<b>19</b>
1. Tipo de estudio .....	19
2. Variables.....	19
3. Animales.....	19
4. Diseño experimental .....	19
4. Dieta de los animales: .....	20
5. Control de peso .....	21
6. Extracción del ARN.....	21
7. Transcripción reversa.....	21

8. PCR en tiempo real.....	22
9. Análisis estadístico .....	23
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>24</b>
1. Expresión de la enzima Monoacilglicerol lipasa ( <i>Magl</i> ) y diacilglicerol lipasa ( <i>Dagl</i> ) en hígados.....	24
2. Expresión de la enzima amido hidrolasa de ácidos grasos ( <i>Faah</i> ) en hígado de ratas.....	25
3. Expresión de <i>Rcb1</i> y <i>Rcb2</i> en hígado de ratas. ....	26
4. Expresión Monoacilglicerol lipasa ( <i>Magl</i> ) y diacilglicerol lipasa ( <i>Dagl</i> ) en grasa retroperitoneal .....	27
5. Expresión ácido graso amida hidrolasa ( <i>Faah</i> ) en grasa retroperitoneal .....	28
6. Expresión de Receptor <i>Rcb1</i> y <i>Rcb2</i> en grasa retroperitoneal .....	28
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>29</b>
<b>Conclusión .....</b>	<b>34</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>35</b>
<b>PROGRAMA ACTIVIDADES TESIS 2016 .....</b>	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>

## RESUMEN

La obesidad es uno de los principales problemas de salud pública en los países desarrollados y en vía de desarrollo. La obesidad durante la gestación conduce al desarrollo de obesidad, hipertensión arterial, síndrome metabólico, resistencia a la insulina en la descendencia e hígado graso no alcohólico en la descendencia. El hígado graso no alcohólico (NAFLD) es una de las enfermedades hepáticas más comunes. El Sistema Endocanabinoide se compone del conjunto de los canabinoides o ligandos endógenos y sus receptores, más la maquinaria enzimática dedicada a la síntesis y degradación de estas moléculas. Aun no existe consenso en el tratamiento ideal para NAFLD, pero entre las estrategias actuales se encuentra el uso de Metformina. La efectividad de la Metformina está explicada por su habilidad de disminuir la glicemia al reducir la gluconeogénesis en hígado, proceso mediado por la fosforilación de AMPK la cual inhibe la actividad de SREBP y FAS. La obesidad aumenta la densidad de RCB1 y la producción de endocanabinoide Anandamida, lo cual provocaría un aumento en la actividad de SREBP y FAS. En base a esto se busca dilucidar si el desarrollo de esteatosis hepática no alcohólica en la descendencia de madres obesas está ligada a una alteración del metabolismo de los lípidos mediada por una mayor expresión de los componentes del sistema endocanabinoide. Para este estudio se utilizó la descendencia de ratas de la cepa Sprague-Dawley sometidas a dieta control, dieta alta en grasa (HF) y dieta alta en grasa tratadas con metformina (HF + Met). Se analizó el peso corporal, la expresión de las enzimas *Magl*, *Dagl* y *Faah*, así también de los receptores *Rcb1* y *Rcb2* en tejido hepático y grasa retroperitoneal. Los resultados obtenidos demuestran que cambios en la dieta durante la gestación afectan a ciertos componentes del sistema endocanabinoide en la descendencia.

## **ABSTRACT**

Obesity is one of the major public health problems in developed and developing countries. Obesity during gestation leads to the development of obesity, arterial hypertension, and metabolic syndrome, insulin resistance in offspring and non-alcoholic fatty liver in offspring. Non-alcoholic fatty liver (NAFLD) is one of the most common liver diseases. The Endocannabinoid System consists of the set of endogenous cannabinoids or ligands and their receptors, plus the enzymatic machinery dedicated to the synthesis and degradation of these molecules. There is still no consensus on the ideal treatment for NAFLD, but the current strategies include the use of Metformin. The effectiveness of Metformin is explained by its ability to lower glycemia by reducing gluconeogenesis in the liver, a process mediated by AMPK phosphorylation which inhibits the activity of SREBP and FAS. Obesity increases the density of RCB1 and the production of endocannabinoid Anandamide, which would cause an increase in the activity of SREBP and FAS. Based on this, it is sought to determine if the development of non-alcoholic liver steatosis in the offspring of obese mothers is linked to an alteration of lipid metabolism mediated by a greater expression of the components of the endocannabinoid system. For this study we used the offspring of Sprague-Dawley rats subjected to control diet, high fat diet (HF) and high fat diet treated with metformin (HF + Met). Body weight, expression of the enzymes *Magl*, *Dagl* and *Faah*, as well as the *Rcb1* and *Rcb2* receptors in hepatic tissue and retroperitoneal fat were analyzed. The results show that changes in diet during gestation affect certain components of the endocannabinoid system in offspring.

## **INTRODUCCIÓN**

### **PREVALENCIA DE OBESIDAD EN EL MUNDO Y CHILE**

La obesidad es uno de los principales problemas de salud pública en los países desarrollados y en vía de desarrollo. Alrededor de 250 millones de personas en el mundo son obesas lo que corresponde a un 7% de la población mundial. En Chile la prevalencia de obesidad es de 25,1%, siendo mayor en mujeres que en hombres y presentando una relación inversa respecto a los años de escolaridad (MINSAL, 2016). En cuanto a la obesidad durante la gestación, en Chile más del 50% de las mujeres embarazadas en control en el Sistema Nacional de Servicios de Salud (SNSS) presentan algún grado de sobrepeso u obesidad (MINSAL, 2016). Durante la gestación es normal que la madre aumente entre 11 a 16 kg de peso, los diferentes componentes del perfil lipídico aumentan, originando un estado de estrés oxidativo, que no es perjudicial para la madre ni el feto; sin embargo, en las mujeres gestantes con obesidad, estos dos eventos se presentan de una forma exacerbada, conllevando a un estado inflamatorio y oxidativo en la madre que alteran el transcurso normal del embarazo (Cadavid, 2013). Al respecto, la hipótesis de “Reprogramación fetal” plantea que las alteraciones en la nutrición y un ambiente endocrino adverso durante la gestación resultarán en el desarrollo de adaptaciones que pueden cambiar de manera permanente la estructura y la fisiología de órganos y tejidos del individuo, lo cual puede predisponer al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, metabólicas y endocrinas en la adultez (Barker, 2001). En humanos se ha descrito que el peso del hijo al nacer se asocia directamente con su IMC y riesgo de obesidad en la adolescencia, junto con presentar mayor riesgo de desarrollar insulinoresistencia y enfermedades cardiovasculares (Fraser, 2010) (Wrotniak Shults, 2008). Por otra parte, la

obesidad adquirida previo o durante el embarazo, altera los niveles de adipocinas, tanto en la madre como en el feto y esto puede afectar diversas vías metabólicas durante el desarrollo adulto del individuo (Solis-Paredes, 2016). Por ejemplo, la obesidad materna está ligada a mayores niveles de leptina en la madre y LDL-C en fetos y menores niveles de resistina (Solis-Paredes, 2016). Asimismo se ha observado en el modelo murino que el uso de dietas altas en lípidos (HFD) o hidratos de carbono durante la gestación conducen al desarrollo de obesidad, hipertensión arterial, síndrome metabólico, resistencia a la insulina en la descendencia (Sedová, 2007 ), además de alteraciones de la función reproductiva e hígado graso no alcohólico en la adultez (Oben J, 2010).

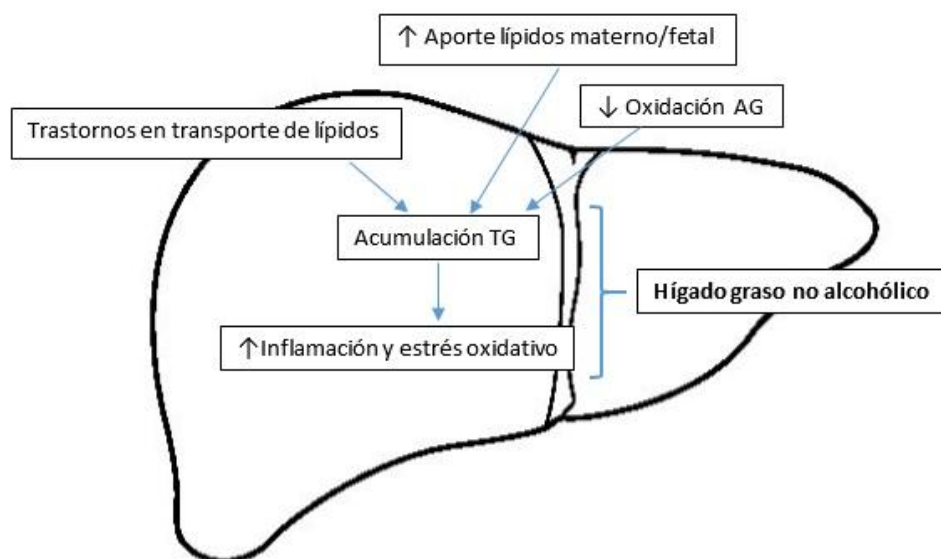
#### **ORIGEN TEMPRANO DE ESTEATOSIS HEPÁTICA NO ALCOHÓLICA.**

Estudios con primates no humanos mostraron que el consumo de HFD durante la gestación, provoca signos de hígado graso en las crías, independiente del estado nutricional de la madre. Dentro de estos signos se encuentra la inflamación hepática, estrés/daño oxidativo, acumulación de triglicéridos en hígado, además de aumento en la expresión hepática de enzimas y factores de transcripción que participan en la gluconeogénesis (McCurdy, 2009). Así también, estudios con roedores han demostrado que ratas con HFD durante la gestación y lactancia conducen al desarrollo de un fenotipo propenso a hígado graso en su descendencia, el cual persiste hasta la adultez. (McCurdy, 2009) (Oben J, 2010) (Ambroseti, 2016).

## **ESTEATOSIS HEPATICA NO ALCOHOLICA.**

El hígado graso no alcohólico o esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD) es una de las enfermedades hepáticas más comunes, cuya prevalencia ha aumentado progresivamente en los últimos 30 años (Lotersztajn, 2010) alcanzando una prevalencia similar a la obesidad.

Como se ejemplifica en la Figura 1, la esteatosis hepática es una condición que se relaciona fuertemente con la obesidad y cuya fisiopatología involucra: (a) Aumento de síntesis de novo de ácidos grasos, (b) aumento del transporte de ácidos grasos desde órganos periféricos al hígado, (c) disminución en la oxidación de ácido grasos y (d) trastornos en el transporte de los ácidos grasos desde el hígado hacia los órganos periféricos. Posterior al desarrollo de la esteatosis hepática ocurre inflamación del hígado, daño hepato-celular y activación de las vías fibrogénicas produciendo un riesgo de 10-20% en el desarrollo de cirrosis o esteatohepatitis a largo plazo (Calzadilla, 2016) (Decara, 2015 ). Estudios recientes han demostrado que el tejido adiposo y la inflamación en hígado juegan un rol fundamental en el desarrollo de NAFLD y resistencia a la insulina. Se ha visto que la expresión de RCB2 aumenta en tejido adiposo e hígado de forma paralela con la inflamación (Deveaux, 2009 ) (A. Mallat, 2010). Así también se ha visto que una mayor actividad de receptor CB1 aumenta la acumulación de lípidos en hígado a través de la estimulación de vías lipogénicas y la inhibición de la  $\beta$ -oxidación. (Mallat, 2011 ), esto mediado por una mayor expresión de la proteína de unión al elemento regulador del esteroil (SREBP) y de las enzimas Acetyl Coenzima-A Carboxilasa-1 y Ácido Graso Sintasa (FAS), además de promover la síntesis de novo de ácidos grasos (Osei-Hyiaman, 2005).



**Figura 1. Procesos que intervienen en el desarrollo de hígado graso no alcohólico:** a) Aumento de síntesis de novo de ácidos grasos, (b) aumento del transporte de ácidos grasos desde órganos periféricos al hígado, (c) disminución en la oxidación de ácido grasos y (d) trastornos en el transporte de los ácidos grasos desde el hígado hacia los órganos periféricos

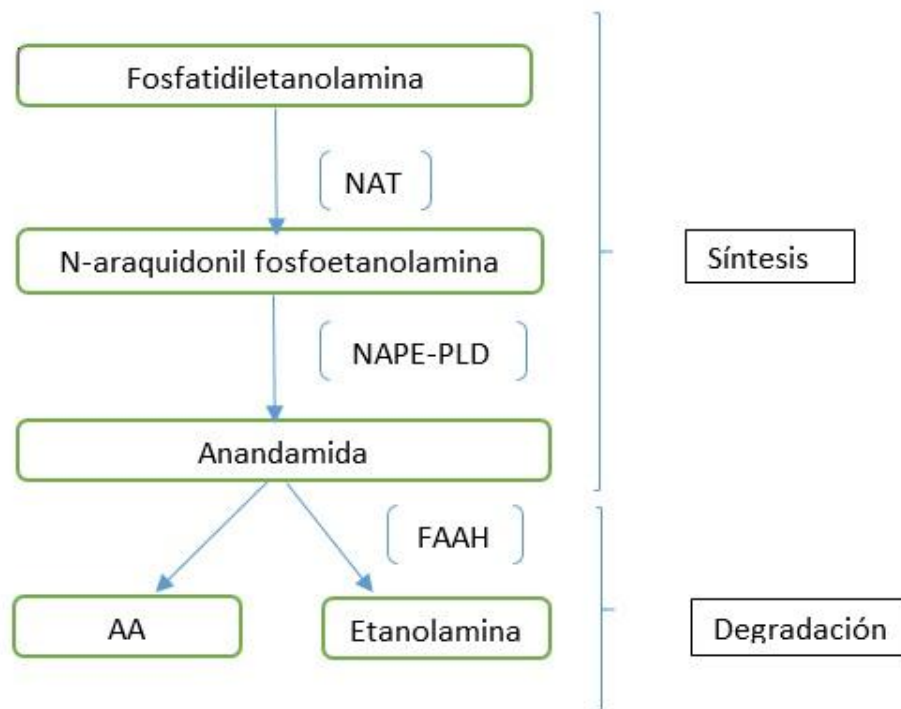
## SISTEMA ENDOCANABINOIDE

El SEC se compone del conjunto de los cannabinoides o ligandos endógenos y sus receptores, más la maquinaria enzimática dedicada a la síntesis y degradación de estas moléculas.

Si bien el compuesto canabinoide más conocido es el *delta-9-tetrahydrocannabinol* ( $\Delta^9$ -THC), no fue hasta casi 30 años después que sus contrapartes endógenas fueron descubiertas.

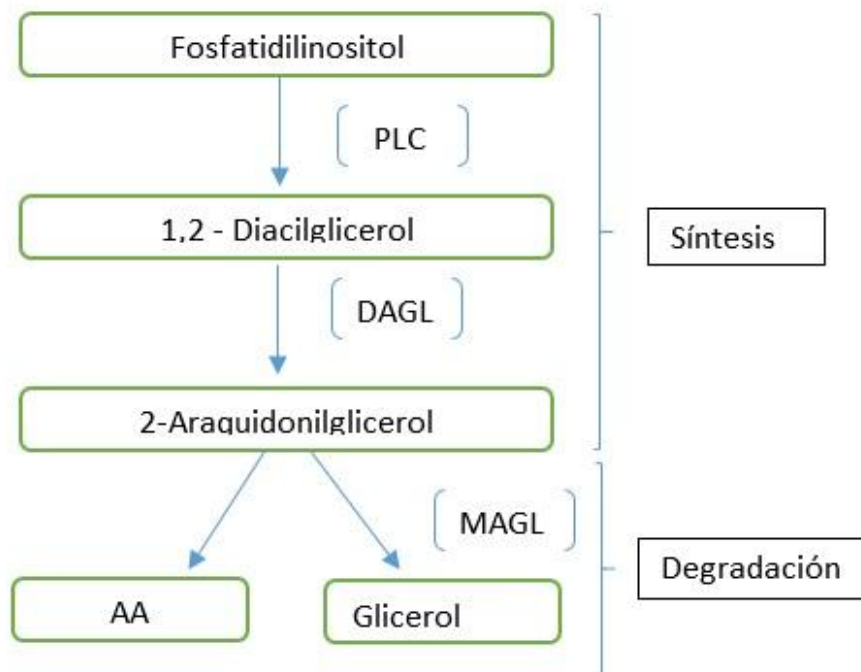
Los endocannabinoides son originados a partir de fosfolípidos de membrana y son principalmente dos: la *N-araquidonoiletanolamida* o Anandamida (AEA) y el *2-araquidonilglicerol* (2-AG).

La AEA fue el primer endocanabinoide en ser aislado (Devane, 1992). AEA se sintetiza a partir de N-araquidonil fosfoetanolamina (NAPE), el cual a su vez es sintetizado a partir de fosfogliceridos y fosfatidiletanolamina en un proceso catalizado por la enzima N-acetiltransferasa (NAT). NAPE puede ser transformado AEA por tres vías distintas, la más importante es la catalizada por la fosfolipasa D específica de N-acil-fosfatidiletanolamina (NAPE-PLD) (Watkins, 2015). La degradación de AEA ocurre a través de la enzima ácido graso amida hidrolasa (FAAH) dando como producto ácido araquidónico (AA) y etanolamina (Gatta-Cherifi, 2016) (Watkins, 2015).



**Figura 2.** Vía metabólica N-araquidonoiletanolamida o Anandamida. **NAT:** N-acetiltransferasa, **NAPE- PLD:** fosfolipasa D específica de N-acil-fosfatidiletanolamina, **FAAH:** ácido graso amida hidrolasa.

Por otra parte, el 2-AG fue aislado por primera vez en 1995 y se comporta como agonista de los receptores de cannabinoides, con mayor potencia que AEA. Como se muestra en la figura 3, el fosfatidilinositol (PI) de membrana da origen a 1,2-diacilglicerol (DAG), el que es convertido a 2-AG como producto de la catálisis secuencial de la fosfolipasa C-Beta (PLC) y la enzima diacilglicerol lipasa (DAGL) (Gatta-Cherifi, 2016) (Watkins, 2015). Finalmente, la degradación de 2-AG es catalizada por la enzima FAAH y monoglicerol lipasa (MAGL) dando como producto ácido araquidónico y glicerol.



**Figura 3. Vía metabólica 2- Araquidonilglicerol.** *PLC:* fosfolipasa C, *DAGL:* diacilglicerol lipasa, *MAGL:* monoacilglicerol lipasas, *AA:* ácido araquidónico

AEA actúa como agonista parcial de RCB1 y podría antagonizar la activación de RCB2 por parte de 2 AG. (Gonsiorek, 2000).

Los receptores de endocannabinoides son receptores acoplados a proteína G, y hasta el momento se han descrito dos: el RCB1 y el RCB2. RCB1 se expresan en mayor proporción que los RCB2 y principalmente pueden ser encontrado en el sistema nervioso central (cerebro anterior, tálamo, y ganglio basal) ( Pál Pacher, 2006) (Mackie, 2008), aunque también pueden ser detectados en órganos y tejidos periféricos como: hígado, páncreas, músculo esquelético y tejido adiposo (Gatta-Cherifi, 2016) (Watkins, 2015) (Mackie, 2008). Por otro lado RCB2 se localizan principalmente en células del sistema inmune, principalmente en las derivadas de macrófagos (células microgliales, osteoclastos y osteoblastos) y bajo ciertas condiciones, en neuronas (Mackie, 2008) (Gatta-Cherifi, 2016) (Watkins, 2015).

## **EL SISTEMA ENDOCANABINOIDE Y SU RELACION CON LA ESTEATOSIS HEPATICA.**

Estudios en animales han demostrado que la exposición a HFD aumenta los niveles hepáticos de AEA, la densidad de receptores CB1 y los niveles basales de síntesis de ácidos grasos (Osei-Hyiaman, 2005) (Shi, 2014) (Jorgačević, 2015). Ratas tratadas con *Rimonabant* (bloqueador sintético de RCB1) presentan una reducción de la masa grasa, los niveles séricos de insulina y triglicéridos en el hígado, además de reducir los niveles de interleuquinas pro-inflamatorias (Zduniak K., 2016), esto mediado a nivel de hipotálamo por una disminución en la expresión de FAS y de SREBP (Osei-Hyiaman, 2005). En un hígado sano la expresión

de RCB1 y RCB2 es modesta, sin embargo, al presentarse un proceso patológico hepático el SEC se activa en células estrelladas, células vasculares hepáticas y en monocitos (Maccarrone, 2016).

Aun no existe consenso en el tratamiento ideal para NAFLD, pero entre las estrategias actuales se encuentra el uso de Metformina. La efectividad de la Metformina como un fármaco antidiabético esta explicada por su habilidad de disminuir la glicemia al reducir la gluconeogénesis en hígado, estimulando el consumo de glucosa en músculo y aumentando la oxidación de ácidos grasos y tejido adiposo, mejorando así la sensibilidad a la insulina.

Respecto al desarrollo de NAFLD se ha propuesto la hipótesis de “Dos golpes”, en el que el “primer golpe” involucra la presencia de IR, lo que aumentará progresivamente la sensibilidad del hígado a distintas injurias (“Segundo golpe”) lo que llevara al a inflamación y fibrosis eventualmente. Considerando la importancia de IR en la patogenia de NAFLD, fármacos que aumenten la sensibilidad de la insulina pueden ser útiles. El fármaco más utilizado en el tratamiento de NAFLD es la metformina. La efectividad de la Metformina como un fármaco antidiabético esta explicada por su habilidad de disminuir la glicemia al reducir la gluconeogénesis en hígado, estimulando el consumo de glucosa en músculo y aumentando la oxidación de ácidos grasos y tejido adiposo, mejorando así la sensibilidad a la insulina, proceso mediado por la fosforilacion de AMPK la cual inhibe la actividad de SREBP y FAS, lo que se traduce en una disminución en la síntesis de novo de lípidos y por tanto menor acumulación de éstos en hígado. Por otra parte la obesidad aumenta la densidad de RCB1 y la producción de AEA, lo cual provocaría un aumento en la actividad de SREBP y FAS, por lo que la administración de metformina ayudar a corregir dicha tendencia.

A partir de la evidencia planteada podemos desprender que el sistema endocanabinoide cumple un rol importante en el desarrollo de esteatosis hepática no alcohólica y su progresión, y es un importante candidato para explicar el desarrollo de hígado graso en la descendencia de madres obesas. A partir de esto se plantea la siguiente hipótesis.

## **HIPOTESIS**

El desarrollo de esteatosis hepática no alcohólica en la descendencia de madres obesas está ligada a una alteración del metabolismo de los lípidos mediada por una mayor expresión de los componentes del sistema endocanabinoide y puede ser prevenida por la administración de metformina durante la gestación.

## **OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar la expresión de componentes del Sistema Endocanabinoide en la descendencia de madres obesas con esteatosis hepática no alcohólica.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar la expresión de monoacilglicerol lipasa (*Magl*), diacilglicerol lipasa (*Dagl*) y amido hidrolasa de ácidos grasos (*Faah*) en el hígado de ratas descendientes de madres normopeso, obesas y obesas tratadas con metformina durante la gestación, mediante la técnica PCR en tiempo Real.
- Determinar la expresión de los receptores de endocannabinoides *Rcb1* y *Rcb2* en el hígado de ratas descendientes de madres normopeso, obesas y obesas tratadas con metformina durante la gestación por PCR en tiempo real.
- Determinar la expresión de monoacilglicerol lipasa (*Magl*), diacilglicerol lipasa (*Dagl*) y amido hidrolasa de ácidos grasos (*Faah*) en la grasa retroperitoneal de ratas descendientes de madres normopeso, obesas y obesas tratadas con metformina durante la gestación, mediante la técnica PCR en tiempo Real.
- Determinar la expresión de los receptores de endocannabinoides *Rcb1* y *Rcb2* en la grasa retroperitoneal de ratas descendientes de madres normopeso, obesas y obesas tratadas con metformina durante la gestación por PCR en tiempo real.

## **MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **1. TIPO DE ESTUDIO**

Estudio analítico experimental trasversal.

### **2. VARIABLES**

Peso corporal, ingesta de alimento, peso hepático, peso de grasa, niveles de ARNm de *Rcb1*, *Rcb2*, *Mag1*, *Dagl* y *Faah*.

### **3. ANIMALES**

Ratas de la cepa Sprague Dawley de 150-250g de peso. Los animales fueron mantenidos bajo condiciones regulares de luz (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad) y temperatura (23 a 25°C) con agua y alimento *ad libitum*. Todos los animales fueron eutanasiados por decapitación utilizando una guillotina para animales menores. Todos los procedimientos experimentales han sido 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).

### **4. DISEÑO EXPERIMENTAL**

Se utilizarán tejidos extraídos de crías de sexo masculino mayores a 50 días de vida de entre 150-250 g de peso corporal de ratas de la cepa Sprague Dawley obtenidas a partir del trabajo previo de tesis de las nutricionistas Daniela Álvarez y Gumercinda Olguín realizado en el

Laboratorio de Alteraciones Reproductivas y Metabólicas de la Universidad de Valparaíso. En dicho estudio se utilizaron 31 ratas hembras de 200-250g de peso, las cuales fueron separadas en tres grupos experimentales; 1) Dieta control, 2) Dieta alta en grasa (HF), 3) dieta alta en grasa + Metformina. Las hembras fueron sometidas a las diferentes dietas 1 semana antes de la cruce. La dieta fue mantenida durante toda la preñez y la lactancia. En el grupo HF + Met, la metformina comenzó a ser administrada en conjunto a la dieta HF. La administración de metformina se mantuvo hasta el final de la gestación. La metformina administrada correspondió a Metformina clorhidrato (Glafornil ® MERCK) disuelta en agua y dispuesta en bebederos para su consumo a una dosis aproximada de 250 mg/Kg peso/día. La solución de metformina fue cambiada 3 veces por semana.

Para esta tesis se utilizaron un total de 19 muestras de hígado, las cuales corresponden a: controles N=8, dieta HF N=6 y HF+MET N=5. Respecto a grasa se utilizaron 17 muestras de grasa blanca retroperitoneal siendo: control N=6, HF N=5 y HF+MET N=6.

#### **4. DIETA DE LOS ANIMALES:**

Las ratas madres se alimentaron con una dieta control (Lab diet) o una dieta alta en grasas (Research Diet™, USA). Las especificaciones alimentarias se detallan en la tabla 1. Todas las ratas descendientes de madres obesas o normopeso con y sin administración de metformina fueron alimentadas con dieta control (Lab diet) desde el destete hasta el momento de la eutanasia.

<b>. Grupo</b>	<b>Control</b>	<b>HF</b>	<b>HF + Met</b>
<b>% Proteínas</b>	23	20	20
<b>% CHO</b>	64	20	20
<b>% Lípidos</b>	13	60	60
<b>Kcal/g</b>	4	5	5

*Tabla 1. Distribución de la molécula calórica de la dieta*

## **5. CONTROL DE PESO**

Se registró diariamente el peso de ratas hembras durante el periodo previo a la concepción, gestación y lactancia. Las crías fueron pesadas diariamente desde su nacimiento hasta el día de la eutanasia. (Anexo 2)

## **6. EXTRACCIÓN DEL ARN**

El ARN total se aisló a partir del tejido hepático extraído de ratas de la cepa Sprague Dawley utilizando el kit comercial (Omega Bio-tek, USA). La extracción de ARN en las muestras de grasa se realizó usando el reactivo TRIzol® (Thermofisher, USA).

## **7. TRANSCRIPCIÓN REVERSA**

La obtención de ADNc a partir del ARN total se realizó utilizando la enzima Superscript II (Invitrogen - Thermo Fisher Scientific, USA) y random primers (Invitrogen - Thermo Fisher Scientific, USA).

## 8. PCR EN TIEMPO REAL

Para realizar la amplificación del ADNc se utilizaron cebadores específicos (Integrated DNA Technologies Inc, USA), En la tabla 2 se detalla la secuencia de los cebadores utilizados y las condiciones para el uso de termociclador., Para la normalización de los datos se utilizó el gen 18s como gen constitutivo. Se utilizó la metodología del “ $\Delta\Delta CT$ ” para el análisis de los datos del qPCR.

<b>Protocolo PCR</b>		
Gen	Secuencia cebadores	Condiciones termociclador
<i>18S</i>	F:TCA AGA ACG AAA GTC GGA GG R: GGA CAT CTA AGG GCA TCA CA	95°C- 10 segundos 58°C- 15 segundos 72°C- 20 segundos 45 ciclos
<i>Dagl</i>	F:GCC ACA GAG CAT AAC AG R: ACA GCA GCC GTC CTT CAG AG	95°C- 10 segundos 62°C- 15 segundos 72°C- 20 segundos 45 ciclos
<i>Faah</i>	F:AAC AGT ATG CGT CCT CGG TCA G R: GGT CAG CAG CAC ATC GTT C	95°C- 10 segundos 63°C- 15 segundos 72°C- 20 segundos 45 ciclos
<i>Magl</i>	F: TCT CGG AAC AAG TCG GAG GTT G R: AGC AGG AAC GGC AGT GTC AG	95°C- 10 segundos 63°C- 15 segundos 72°C- 20 segundos 45 ciclos
<i>Rcb1</i>	F: ACC TAC CTG ATG TTC TGG ATT GGG R: CGT GTG GAT GAT GAT GCT CTT CTG	95°C- 10 segundos 62°C- 15 segundos 72°C-20 segundos 45 ciclos
<i>Rcb2</i>	F:ACT GCC TGC TGC GGA CAT C R: GTC GAT TGG TCT TCT CAC TGA ACA C	95°C- 10 segundos 62°C- 15 segundos 72°C-20 segundos 45 ciclos

*Tabla 2. Secuencia partidores utilizados y protocolo según gen.*

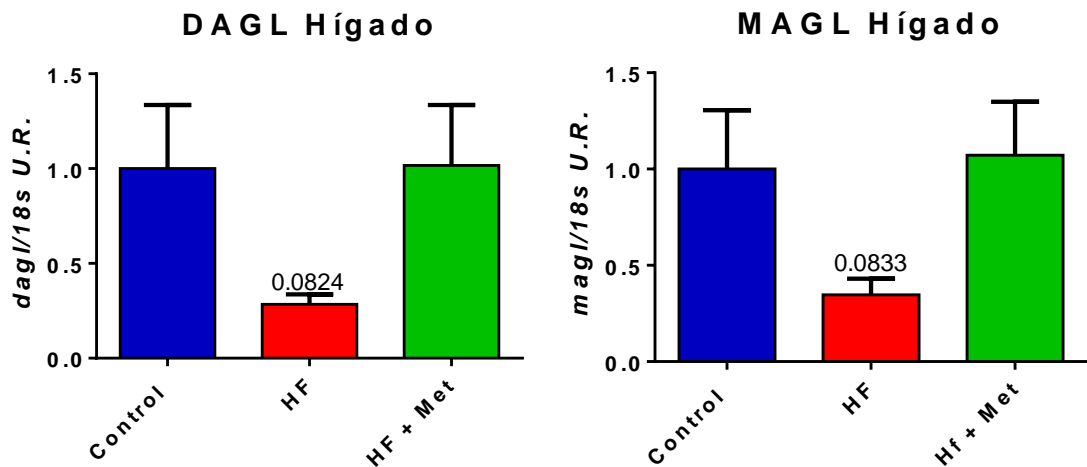
## **9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos fueron analizados utilizando el programa GraphPad Prism® versión 6.01. Los resultados fueron expresados como el promedio + error estándar promedio (SEM). Se analizó la distribución de las variables analizadas con el test de normalidad D'Agostino-Pearson. Luego se realizó la comparación de las medias con el test ANOVA o Kruskal-Wallis según la distribución de las variables. Se consideró un valor de  $p < 0.05$  para indicar diferencias estadísticamente significativas.

## RESULTADOS

### 1. EXPRESIÓN DE LA ENZIMA MONOACILGLICEROL LIPASA (MAGL) Y DIACILGLICEROL LIPASA (DAGL) EN HÍGADOS.

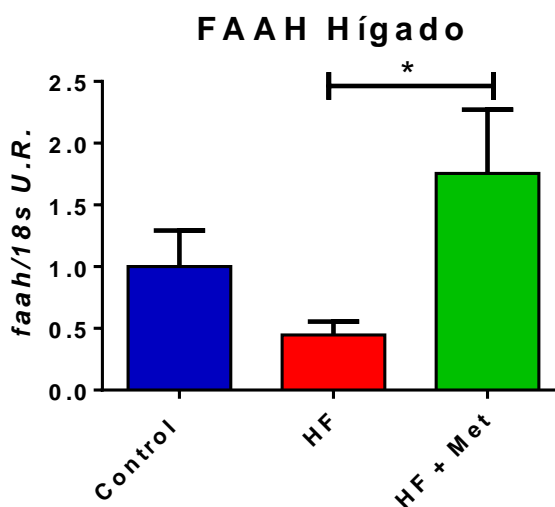
Se midió los niveles del ARNm de las enzimas MAGL y DAGL en tejido hepático de ratas descendientes de madres alimentadas con una dieta alta en grasa con y sin tratamiento con metformina, comparado con ratas descendientes de madres alimentadas con una dieta control. Los resultados muestran una tendencia a la disminución de *Dagl* ( $P=0,0824$ ) y *Magl* ( $P=0,0833$ ) en el grupo HF. Esta tendencia a la disminución ocasionada por la dieta HF fue prevenida por la administración de metformina a las madres previo y durante la preñez.



**Figura 4. Expresión de *Dagl* y *Magl* en hígado de ratas.** En la figura se observan los niveles de ARNm de las enzimas a) diacilglicerol lipasa y b) monoacilglicerol lipasa normalizado por el gen constitutivo 18s en hígado de ratas descendientes de madres alimentadas con una dieta alta en grasa, comparado con ratas hijos de madres alimentadas con una dieta control. **Control** N=8, **HF** N=6 y **HF+Met** N=5. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$ SEM.

## 2. EXPRESIÓN DE LA ENZIMA AMIDO HIDROLASA DE ÁCIDOS GRASOS (FAAH) EN HÍGADO DE RATAS.

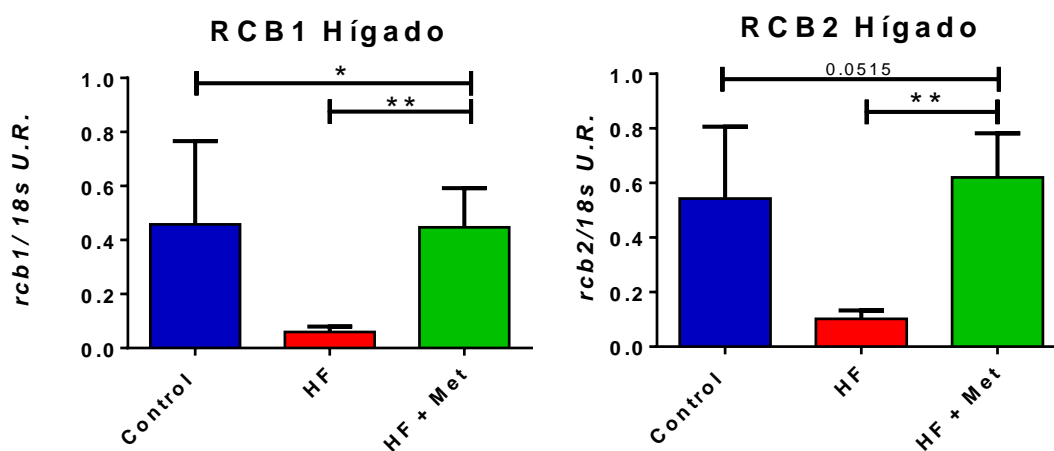
Se cuantificaron los niveles del ARNm de la enzima FAAH en hígado de ratas descendientes de madres alimentadas con una dieta alta en grasa con y sin tratamiento con metformina, comparado con ratas descendientes de madres alimentadas con una dieta control. Como se observa en la figura 6, se puede observar una disminución en la expresión de *Faah* ( $p=0,097$ ) en las ratas hijos de madres obesas respecto del grupo HF+MET. Esta disminución fue prevenida por la administración de metformina, previo, durante la preñez y lactancia a las madres.



**Figura 5. Expresión de *Faah* en hígado de ratas.** En la figura se observan los niveles de ARNm de la enzima ácido graso amida hidrolasa normalizado por el gen constitutivo *18s* en hígado de ratas descendientes de madres obesas. **Control**  $N=8$ , **HF**  $N=6$  y **HF+Met**  $N=5$ . Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$ SEM.

### 3. EXPRESIÓN DE *RCB1* Y *RCB2* EN HÍGADO DE RATAS.

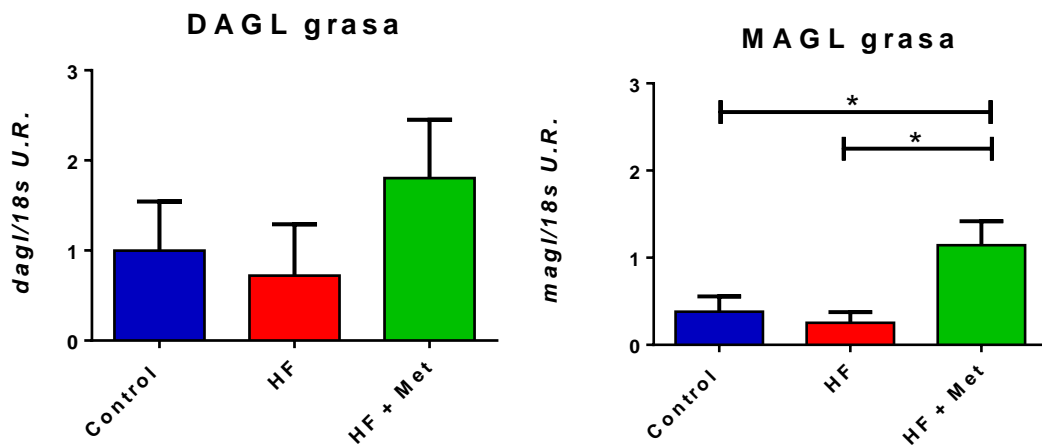
Se midió el nivel de ARNm de los receptores de endocannabinoides *RCB1* y *RCB2* en muestras de tejido hepático en ratas descendientes de madres alimentadas con una dieta alta en grasa con y sin tratamiento con metformina, comparado con ratas hijos de madres alimentadas con una dieta control. Como se observa en la figura 7, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y HF, pero cuando éstos son comparados con el grupo HF+Met se observó un aumento significativo tanto para el *Rcb1* como para *Rcb2*.



**Figura 6. Expresión de *RCB1* y *RCB2* en hígado de ratas.** En la figura se observan los niveles de ARNm de los receptores *RCB1* y *RCB2* normalizado por el gen constitutivo *18s* en hígado de ratas descendientes de madres obesas. **Control** N=8, **HF** N=6 y **HF+Met** N=5.  $p < 0,05 = *$  y  $p < 0,01 = **$ . Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$ SEM.

#### 4. EXPRESIÓN MONOACILGLICEROL LIPASA (MAGL) Y DIACILGLICEROL LIPASA (DAGL) EN GRASA RETROPERITONEAL

Se midieron los niveles de ARNm de las enzimas MAGL y DAGL en tejido graso retroperitoneal de ratas descendientes de madres alimentadas con una dieta alta en grasa con y sin tratamiento con metformina, comparado con ratas hijos de madres alimentadas con una dieta control. Cuando se observa la expresión de la *Dagl* los resultados no muestran diferencia significativas entre ninguno de los grupos analizados. Contrario a esto, cuando se observa la *Magl* sólo se observa un aumento significativo en el grupo HF+Met comparado con el grupo control y el grupo HF.



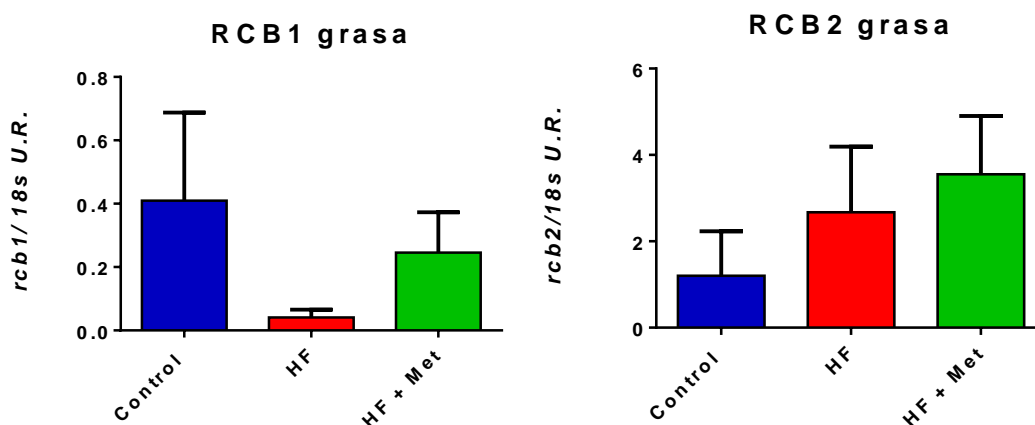
**Figura 8. Expresión de *Dagl* y *Magl* en grasa retroperitoneal de ratas.** En la figura se observan los niveles de ARNm de las enzimas diacilglicerol lipasa y monoacilglicerol lipasa normalizado por el gen constitutivo 18s en grasa retroperitoneal de ratas descendientes de madres obesas. **Control** N=8, **HF** N=6 y **HF+Met** N=5.  $p < 0,05 = *$ . Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$ SEM.

## 5. EXPRESIÓN ÁCIDO GRASO AMIDA HIDROLASA (FAAH) EN GRASA RETROPERITONEAL

En grasa retroperitoneal *Faah* no se expresó.

## 6. EXPRESIÓN DE RECEPTOR *RCB1* Y *RCB2* EN GRASA RETROPERITONEAL

Se midieron los niveles de ARNm de los receptores *RCB1* y *RCB2* en tejido grasa retroperitoneal de ratas descendientes de madres alimentadas con una dieta alta en grasa con y sin tratamiento con metformina, comparado con ratas hijos de madres alimentadas con una dieta control. No se observaron cambios significativos en la expresión de *Rcb1* y *Rcb2*.



**Figura 9.** Expresión de *Rcb1* y *Rcb2* en grasa retroperitoneal de ratas. En la figura se observan los niveles de ARNm de los receptores *RCB1* y *RCB2* normalizado por el gen constitutivo *18s* en grasa peritoneal ratas descendientes de madres obesas. Control N=8, HF N=6 y HF+Met N=5.  $p < 0,05 = *$ . Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$ SEM.

## **DISCUSIÓN**

En este estudio se trabajó con ratas a las cuales se les sometió a un ambiente intrauterino anormal. Este ambiente se caracterizó por un mayor aporte total de lípidos a través de la dieta a las madres durante la gestación.

A través de esta investigación se pudo observar dos escenarios distintos, el primero nos habla del efecto de la dieta de la madre y el segundo sobre el efecto que podría tener la administración de un fármaco de uso común durante la gestación sobre la descendencia.

En el caso de madres a las cuales se les administró dieta HF, es posible que hayan presentado una mayor actividad del SEC mediado por un aumento de actividad de las enzimas, receptores y de compuestos endocannabinoides circulantes. Lo cual, considerando que los compuestos endocannabinoides son capaces de cruzar la placenta, pueden haber programado a la descendencia y que ésta como mecanismo compensatorio ante este medio haya disminuido la expresión de las enzimas participantes de la síntesis de compuesto endocannabinoides como ocurrió en este estudio.

Por otra parte, en el grupo al que se le administró metformina, se pudo ver en su descendencia un aumento en la expresión de ambos receptores endocannabinoides. Lo cual se podría entender mediante el efecto del fármaco. El cual además de disminuir la glicemia a través de un aumento en la gluconeogénesis en hígado y la estimulación del consumo de glucosa en musculo, también aumenta la oxidación de ácidos grasos y tejido adiposo. Esto provoca una disminución en la síntesis de ácidos grasos y colesterol. Lo cual podría afectar la

concentración de EC circulantes generando como respuesta adaptativa el aumento en la expresión de RCB1 y RCB2.

Por otro lado, la dietoterapia cumple un rol primordial en el tratamiento de patologías tales como; diabetes mellitus 2 (DM2), diabetes gestacional (DG) y en NAFLD. Todas patologías donde el tratamiento farmacológico de base suele ser metformina. En el caso de la diabetes gestacional lo que se busca tradicionalmente es la reducción del consumo de hidratos de carbono o selección de éstos, priorizando a los complejos. Olvidando hasta cierto punto los otros macronutrientes. Este tipo de estrategias busca mejorar el estado general de la gestante de manera aguda, dejando de lado el efecto que podría tener sobre la descendencia.

Si se tomase en consideración de igual manera el bienestar de ambas partes, una dieta normo calórica con selección de lípidos podría resultar una mejor opción. Se ha visto que dietas normo calóricas que solo difieren en el tipo de ácido graso aportado, sea este de la familia de los omega 3 o 6 pueden afectar directamente al SEC. La selección de omega 3, en particular DHA, en ratones demostró una disminución en el tejido adiposo y alteró la expresión de los genes del SEC reduciendo la activación de RCB1 así también alterando genes involucrados en la utilización de glucosa en musculo. (J. Kim, 2016) Lo cual a su vez mejoraría la respuesta a la insulina y por consecuencia ayudaría a la resolución de la DG.

El feto posee una capacidad limitada de modificar la estructura de los ácidos grasos esenciales, por lo que los derivados de cadena larga provenientes de la madre a través de la placenta son utilizados como precursores metabólicos en la síntesis de endocannabinoides. Es por esto que la nutrición materna afecta los niveles y/o la producción en el feto de este tipo de compuestos.

Respecto a NAFLD aún no existe consenso en su tratamiento ideal. La mayoría de las estrategias terapéuticas actuales buscan disminuir la insulinoresistencia, así como también el proceso inflamatorio y fibrosis hepática. La terapia más habitual es el uso de Metformina.

A nivel molecular algunos de los beneficios que se le han ligado a este fármaco han estado relacionados a la fosforilación y transporte nuclear de LKB1. Esta quinasa activa a AMPK, un regulador del metabolismo energético capaz de estimular la producción de ATP a través de vías catabólicas (glicolisis, peroxidación, biogénesis mitocondrial) y de inhibir el consumo de ATP en procesos anabólicos (gluconeogénesis, síntesis de glicógeno, ácidos grasos y proteínas). La activación de AMPK por parte de la metformina ejerce efectos beneficiosos también en el metabolismo de lípidos. Ante la fosforilación provocada por Metformina, AMPK inactiva a actil-CoA carboxilasa (ACC) y a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa, disminuye la expresión de ácido graso sintasa (FAS) y activa a malonil-CoA carboxilasa. El efecto final es una disminución de la síntesis de ácidos grasos y colesterol. Además, AMPK inhibe a SREBP-1c, el cual es un factor de transcripción para genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos. SREBP es inducido por el exceso de glucosa e insulina y se ve aumentado en pacientes con NAFLD.

El sistema endocanabinoide, en particular la activación de RCB1 cumple un rol fundamental en este proceso ya que inhibe a AMPK, lo que favorecerá la actividad de FAS y SREBP perpetuando la progresión de NAFLD. Y aquí es donde la dieta vuelve a cobrar importancia, si una gestante con DG o con NAFLD se le trata con metformina, probablemente controlará las alteraciones bioquímicas en ella, pero ¿Qué ocurrirá con su hijo? Si tiene mayor expresión

de RCB1 y RCB2 y se expone a una dieta alta en omega 6 ¿La respuesta de SEC será exacerbada? De ser así, aquel individuo tiene mayor riesgo de desarrollar obesidad, insulino resistencia y/o NAFLD en el futuro. Si se considera que la dieta occidental actual tiende a un desbalance entre la proporción de omega 6 y omega 3 consumido, siendo mayor el consumo del primero, tales como, ácido araquidónico y ácido linoleico, se verá favorecida la producción de AEA.

Se ha visto que una dieta con una proporción baja entre los ácidos grasos n-6/n-3 en edad temprana reducen los niveles de endocannabinoides en hígado (Demizieux, 2016), por lo que realizar una selección de lípidos en la dieta en la cual se favorezca el consumo de omega 3 podría ayudar a controlar esto.

Otra alternativa interesante de considerar es el uso de *Cannabidiol* (CBD). CBD es un canabinoide, que al igual que THC proviene de la planta *Cannabis Sativa*, pero que a diferencia de éste no posee cualidades psicotrópicas. CBD actúa como antagonista de RCB1 y agonista inverso de RCB2, esto podría provocar un efecto similar a la administración de *Rimonabant*, además de actuar como antiinflamatorio e inmunosupresor por su interacción con RCB2. Su efecto administrado de vía oral a través de una matriz alimentaria es un tema interesante de investigar.

Una de las limitaciones de este estudio es que no se pudo medir concentración de endocannabinoides en ningún tejido. Aunque existe evidencia en que se relaciona la actividad del sistema endocanabinoide con distintos efectos fisiológicos, estos estudios han sido realizados en individuos tratados directamente, no en su descendencia. El saber cómo la dieta o el estado nutricional de la madre durante la gestación afectarán al sistema endocanabinoide

en la descendencia es algo que hasta donde es de mi saber no se ha estudiado y que a partir de los resultados obtenidos en este estudio podemos ver si ocurre.

## CONCLUSIÓN

- En ratas descendientes de madres tratadas con dieta HF se vio una disminución de la expresión de las enzimas propias del SEC, lo cual se podría deber a una forma de adaptación a un medio intrauterino rico en EC.
- En ratas descendientes de madres tratadas con dieta HF+Met se vio un aumento de la expresión de RCB1 y RCB2, lo cual podría aumentar el riesgo de desarrollar obesidad, NAFLD y/o resistencia a la insulina en el futuro.

## REFERENCIAS

- A. Mallat, S. L. (2010). Endocannabinoids and Their Role in Fatty liver disease. *Digestive Disease*, 261-266.
- Ambroseti, R. R.-M.-Z. (2016). Increase in endogenous estradiol in the progeny of obese rats is associated with precocious puberty and altered follicular. *Endocrine*.
- Barker, K. M. (2001). Fetal programming and adult health. *Public Health Nutrition*, 611-624.
- Berger, C. B. (2001). Anandamide and diet: Inclusion of dietary arachidonate and docosaheptaenoate leads to increased brain levels of the corresponding N-acyl ethanolamines in piglets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 6402-6206.
- Blüher, E. K. (2006). Dysregulation of the Peripheral and Adipose Tissue Endocannabinoid System in Human Abdominal Obesity. *Diabetes*, 3053–3060.
- Cadavid, E. J. (2013). ¿Pueden los ácidos grasos omega 3 y 6 contrarrestar los efectos negativos de la obesidad en la gestación? *Rev. chil. obstet. ginecol.*
- Calzadilla, A. (2016). The Natural Course of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci*.
- Carina Valenzuela, V. C. (2014). Sistema endocanabinoide y desarrollo de esteatosis hepática. *Rev. Med Chile*, 353-359.

- Connor, B. M. (2013). Nature, nurture or nutrition? Impact of maternal nutrition on maternal care, offspring development and reproductive function. *Journal of Physiology*, 590.
- Decara, P. S.-C. (2015 ). Treatment with a novel oleic-acid-dihydroxyamphetamine conjugation ameliorates non-alcoholic fatty liver disease in obese Zucker rats. *Dis Model Mech.* , 1213-25.
- Demizieux, P. T.-F. (2016). Early low fat diet enriched with linolenic acid reduces liver endocannabinoid tone and improves late glycemic control after high fat diet challenge in mice. *Diabetes*.
- Devane, H. B. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258.
- Deveaux, C. I.-C.-B. (2009 ). Cannabinoid CB2 receptor potentiates obesity-associated inflammation, insulin resistance and hepatic steatosis. *PLoS One.* .
- Eberlé, H. B. (2004). SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie*, 839-848.
- Fraser, T. M.-W. (2010). Association of Maternal Weight Gain in Pregnancy With Offspring Obesity and Metabolic and Vascular Traits in Childhood. *Circulation*.
- Gatta-Cherifi, C. (2016). New insights on the role of the endocannabinoid system in the regulation of energy balance. *International Journal of Obesity*, 179.

- Gonsiorek, L. F. (2000). Endocannabinoid 2-arachidonyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: antagonism by anandamide. *Mol Pharmacol*, 1045-1050.
- J. Kim, M. C. (2016). Dietary DHA reduces downstream endocannabinoid and inflammatory gene expression and epididymal fat mass while improving aspects of glucose in muscle in C57BL/6J mice. *International Journal of Obesity*, 129-137.
- Jorgačević, M. . (2015). Rimonabant Improves Oxidative/Nitrosative Stress in Mice with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Oxid Med Cell Longev*. .
- Lotersztajn, M. (2010). Endocannabinoids and Their Role in. *Digestive Diseases*, 261-266.
- Maccarrone, B. B. (2016). Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. *Trends Pharmacol Sci*. .
- Mackie. (2008). Cannabinoid Receptors: Where They are and What They do. *Journal of Neuroendocrinology*, 10-14.
- Maliqueo, E. (2014). Programación fetal en las enfermedades metabólicas. *Sociedad de Farmacología de Chile*, 33-46.
- Mallat, T.-C. D. ( 2011 ). The endocannabinoid system as a key mediator during liver diseases: new insights and therapeutic openings. *Br J Pharmacol*.
- McCurdy, B. W. ( 2009). Maternal high-fat diet triggers lipotoxicity in the fetal livers of nonhuman primates. *J Clin Invest.*, 323-35.

MINSAL. (1 de Septiembre de 2016). Obtenido de Ministerio de Salud, Gobierno de Chile:

<http://www.minsal.cl/>

Oben J, M. S.-T.-G. (2010). Maternal obesity during pregnancy and lactation programs the development of offspring non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Journal of Hepatology*, 913-920.

Oben, M. S.-T.-G. (s.f.).

OMS. (Septiembre de 2016). *Organización Mundial de la Salud*. Obtenido de [www.who.int](http://www.who.int)

Osei-Hyiaman, D. L. (2005). Endocannabinoid activation at hepatic CB1. *The Journal of Clinical Investigation*, 1298-1305.

Pál Pacher, S. B. (2006). The Endocannabinoid System as an Emerging Target of Pharmacotherapy. *Pharmacol Rev.*, 389–462.

Ravelli, v. D. ( 1999 ). Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *Am J Clin Nutr.*, 811-816.

Sedová, S. K. (2007 ). Sucrose feeding during pregnancy and lactation elicits distinct metabolic response in offspring of an inbred genetic model of metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* , 1318-1324.

Shi, Z. Y. (2014). Inhibiting CB1 receptors improves lipogenesis in an in vitro non-alcoholic fatty liver disease model. *Lipids Health Dis.*

Solis-Paredes, E. y.-G.-S.-C.-B.-F.-N.-D.-E. (2016). Maternal and Fetal Lipid and Adipokine Profiles and Their Association with Obesity. *International Journal of Endocrinology*.

- Watkins, K. (2015). The endocannabinoid system: directing eating behavior and macronutrient metabolism. *Front Psychol.*
- Wrotniak Shults, B. S. (2008). Gestational weight gain and risk of overweight in the offspring at age 7 y in a multicenter, multiethnic cohort study<sup>1,2,3</sup>. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1818-1824.
- Yan Li, L. L. (2013). Metformin in non alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta analysis. *Biomedical Reports*, 57-64.
- Zduniak K., P. Z.-E. (2016). Immunohistochemical analysis of cannabinoid receptor 1 expression in steatotic rat livers. *Experimental and therapeutic medicine*, 1227-1230.

# ANEXOS

Anexo 1: Programa actividades tesis 2016

Actividades	Mayo				Junio				Julio				Agosto				Septiembre				Octubre				Noviembre				Diciembre							
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4				
	Semana																																			
Elaboración marco teórico	x	x	x	x																																
Revisión literatura	x	x	x	x																																
Extracción y recopilación información	x	x	x	x																																
Construcción marco teórico			x	x																																
Establecer hipótesis			x	x																																
Detectar y definir variables			x	x																																
Enunciar la solución del problema			x	x																																
Determinar muestra del estudio			x	x																																
Diseño experimental						x	x																													
Selección muestra						x	x																													
Purificación muestra							x	x																												
Extracción ARNm							x	x																												
Transcripción inversa									x	x																										
PCR en tiempo real											x	x																								
Análisis resultados																																				
Desarrollo tesis (escrito)																																				
Entrega de tesis																																				x

Anexo 2: Peso corporal de las ratas descendientes de madres obesas con y sin metformina comparado con grupo control.

