



FACULTAD DE FARMACIA
ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA
FACULTAD DE CIENCIAS
LABORATORIO DE ALTERACIONES REPRODUCTIVAS Y
METABÓLICAS

**EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO CON METFORMINA PREVIO Y
DURANTE LA PREÑEZ EN RATAS GESTANTES OBESAS Y SUS
EFECTOS SOBRE LA ESTEROIDOGÉNESIS EN LA DESCENDENCIA
FEMENINA ADULTA.**

Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico.

INGRID ALEJANDRA ARIAS OSORIO

DIRECTOR DE TESIS: DR. GONZALO CRUZ NECULPÁN

2017

|

A mis amados padres.

Agradecimientos

Quiero agradecer y dedicar este trabajo a mis padres, Sandra y Vicente por haberme dado su amor y apoyo incondicional durante toda la vida y por haberme alentado desde pequeña al camino del conocimiento. Los amo hasta el infinito.

A Fernando por su amor y por haber estado conmigo en los momentos en los que más lo necesité y hacer de mis días difíciles momentos felices. Gracias por todo tom.

A Silvana y Fernanda, mis amigas queridas por haberme acompañado todos estos años, sin ustedes el paso por la universidad no habría sido lo mismo, juntas desde principio a fin.

Al Dr. Cruz, a la Dra. Fernandois y al Dr. Martínez por brindarme su tiempo y sus enseñanzas en todo este proceso. Gracias por la paciencia y su amabilidad, nunca cambien.

A Tania Cerda y a mis compañeras de laboratorio, agradezco enormemente su dedicación y esfuerzo, ya que sin su trabajo esto no hubiese sido posible.

¡Gracias a todos ustedes, los llevo en mi corazón!

Financiamiento

Esta tesis fue financiada por el proyecto FONDECYT de iniciación en investigación n°11130707, cuyo investigador principal es el Dr. Gonzalo Cruz Neculpán.

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

Resumen

La obesidad es un problema de salud pública que ha aumentado progresivamente a nivel mundial. En mujeres gestantes, está relacionado con enfermedades crónicas no transmisibles y otros padecimientos reproductivos en la madre y la descendencia. Estudios demuestran que metformina revierte alteraciones metabólicas en la madre gestante sin producir malformaciones en el feto. En este estudio, se evaluó el efecto de la obesidad materna y sus consecuencias a nivel de esteroidogénesis en la descendencia y cómo el tratamiento con metformina durante la gestación interviene esto. Para lo cual, ratas hembras de la cepa Sprague Dawley fueron alimentadas con una dieta alta en grasa y tratadas con metformina durante la gestación, para analizar los efectos en la progenie femenina.

El objetivo fue comprobar el efecto de metformina sobre componentes clave en la vía esteroidogénica ovárica. Se cuantificó la expresión génica de *Star*, *Cyp11a1*, *Hsd3b2* y *Cyp19a1* mediante RT-PCR en tiempo real y se evaluó la expresión de la enzima CYP450SCC mediante Western Blot, así como los niveles de progesterona, testosterona y estradiol séricos mediante ELISA. Se encontró que metformina disminuye los niveles de estradiol y testosterona para grupos de crías de madres control y obesas, además, aumenta la expresión génica de *Star* y *Cyp11a1* junto con la expresión proteica de CYP450SCC.

En conclusión, metformina no previene las alteraciones provocadas por la obesidad materna en la esteroidogénesis ni en la expresión de enzimas esteroidogénicas en la crías. Es más, el tratamiento con metformina en el periodo gestacional aumenta la expresión de estas enzimas en la adultez en los grupos tratados.

**EVALUATION OF TREATMENT PREVIOUS AND DURING PREGNANCY WITH METFORMIN IN
OBESE MOTHER RATS AND ITS EFFECTS ON STEROIDOGENESIS IN ADULT FEMALE
DESCENDANCE**

Obesity is a public health problem that has progressively increased at global level. In pregnant women obesity is a factor that is related to chronic diseases and other reproductive dysfunctions in the mother and offspring. Several studies have shown that metformin is capable of reversing altered metabolic parameters in the pregnant mother without producing congenital malformations in the fetus. The present study evaluated the effect of maternal obesity and its consequences at the level of steroidogenesis in offspring of obese mothers and how the treatment with metformin during gestation intervenes this. For this, Sprague Dawley rats were fed a high fat diet and treated with metformin, to later analyze the effects on the female progeny.

The aim of this work was testing the effects of metformin on the components of the steroid hormone synthesis pathway in the ovary and evaluating the concentration of sex hormones. To quantify the genetic and protein expression, qRT-PCR and Western blotting for the enzyme CYP450SCC were performed in the ovary of the offspring, as well as serum progesterone, testosterone and estradiol levels by ELISA.

We found that metformin decreases the levels of estradiol and testosterone for the offspring of control and obese mothers. In addition, metformin increased gene expression of *Star* and *Cyp11a1* and the protein expression of the enzyme CYP450SCC.

In conclusion, metformin did not prevented effects of maternal obesity on the hormonal profile and the gene expression of steroidogenic enzymes in the offspring. Moreover, the metformin treatment during pregnancy accentuates the increase in gene expression of the adult rats with respect to the control group.

Índice

Introducción	5
Hipótesis	11
Objetivo general	12
Objetivos específicos	12
Materiales y métodos	13
Animales.....	13
Diseño experimental	13
Tratamiento con metformina	14
Extracción y cuantificación de RNA	14
Determinación de los niveles séricos de Estradiol y Testosterona por Inmuno-ensayo ligado a enzima (ELISA)	15
Cuantificación relativa de la expresión de <i>Star</i> , <i>Cyp11a1</i> , <i>Hsd3b2</i> y <i>Cyp19a1</i> por RT-PCR en tiempo real.....	16
Extracción de proteínas de tejido ovárico	17
Cuantificación de proteínas.....	17
Determinación de la expresión proteica de la enzima p450 side chain cleavage (CYPSCC) mediante Western blot.....	17
Análisis estadístico	19
Resultados	20
Concentración sérica de progesterona, testosterona y estradiol.....	20
Expresión génica de la proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis (<i>Star</i>).....	21
Expresión génica de la enzima CYP450SCC (<i>Cyp11a1</i>)	22
Expresión génica de la enzima 3β-Hidroxiesteroide deshidrogenasa (<i>Hsd3b2</i>)	23
Expresión génica de la enzima aromatasa (<i>Cyp19a1</i>)	24
Expresión proteica de la enzima CYP450SCC.....	25
Discusión	26
Conclusión	34
Bibliografía	35
Anexos	41

Introducción

La obesidad es descrita por la OMS como una acumulación excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud [1]. La prevalencia de obesidad se ha transformado en una epidemia que aqueja a la humanidad. Al año 2014 cerca de 1900 millones de adultos en el mundo presentan sobrepeso u obesidad, siendo el doble que en 1980 [1]. La obesidad afecta de igual manera a países con altos ingresos económicos y a países de ingresos medianos o bajos, convirtiéndose en uno de los problemas más importantes de salud pública [1]. La obesidad implica altos costos sociales y económicos debido a su estrecha relación con enfermedades crónicas no transmisibles tales como: enfermedades cardiovasculares (hipertensión arterial, accidente cerebro vascular), Diabetes Mellitus tipo 2 y trastornos del metabolismo lipídico [2], provocando una drástica disminución en la esperanza de vida en un individuo hasta en 10 años [3].

Según la Encuesta Nacional de Salud (ENS) del año 2010, Chile no es la excepción a esta realidad, evidenciándose un 67% de la población mayor de 15 años con algún grado de sobrepeso, presentándose una mayor prevalencia en mujeres [4]. Se estima que un 51% de las mujeres chilenas entre 15 y 44 años de edad presenta algún grado de exceso de peso, es decir, alrededor de la mitad de las mujeres en edad reproductiva fértil presenta sobrepeso u obesidad [5]. Esto se ve reflejado en un aumento de la prevalencia de obesidad gestacional en Chile de un 27,8% en el año 2014 a un 29,93% en el año 2015 [6].

Por lo tanto, es importante tener en cuenta este factor en las consecuencias a corto y largo plazo que pueda tener tanto para la madre como para su descendencia. Durante el embarazo, la obesidad incrementa la probabilidad de manifestar complicaciones a corto plazo tales como diabetes gestacional y preeclampsia, además de otros trastornos hipertensivos que aumentan junto con la gravedad de la obesidad [7].

La obesidad materna puede afectar a la descendencia provocando un aumento de peso al nacer, macrosomía, anormalidades congénitas, así como un mayor riesgo de tener bebés prematuros, además de un aumento en la mortalidad perinatal [8]. Las complicaciones a largo plazo que se vinculan a la obesidad materna son el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles en la descendencia, tales como: Diabetes Mellitus tipo II, enfermedades cardiovasculares (como

hipertensión arterial) y dislipidemias [7], e incluso se ha sugerido una relación con el desarrollo de ciertos tipos de cáncer, por ejemplo el cáncer de mama [9].

Aunque estilos de vida poco saludables favorecen el desarrollo de la obesidad, las condiciones nutricionales en etapas críticas de la vida, tal como lo es el periodo gestacional, pueden influir en la salud de la descendencia incrementando el riesgo de desarrollar obesidad y consecuentemente enfermedades metabólicas [10]. El fenómeno que describe que estímulos nocivos en estadios tempranos del desarrollo puede resultar en efectos deletéreos durante la adultez ha sido definido como programación (Programming) [11]. La evidencia ha confirmado en humanos y modelos animales que las afectaciones de la obesidad son transmitidas de una generación a otra lo cual sugiere que un ambiente perigestacional obesogénico puede desatar distintos síndromes en la descendencia los cuales pueden manifestarse ya sea desde etapa neonatal o incluso en la adultez [12, 13].

Obesidad y alteraciones reproductivas en madres y descendencia.

Es conocido el hecho de que la obesidad afecta negativamente la fertilidad femenina, siendo asociado con eventos de anovulación [14], además de las complicaciones en el embarazo mencionadas previamente. Estudios realizados en ratones con obesidad inducida por una dieta alta en grasa, han demostrado que dicha dieta conduce a la anovulación en conjunto con una maduración tardía de los ovocitos [15-17]. De igual forma, se ha evidenciado una disminución en la fertilidad en ratas obesas en comparación con el grupo control [18]. Análogamente, los estudios clínicos realizados en mujeres que se someten a procesos de fertilización asistida demuestran que la obesidad afecta negativamente la fertilización y la maduración del ovocito [19]. Adicionalmente, la obesidad se ha asociado con anomalías cromosómicas [20].

En ratas, la obesidad materna inducida con una dieta alta en grasa se ha asociado con una pubertad adelantada en la progenie femenina en conjunto con una elevación en los niveles de progesterona, ambos efectos serían independientes de las dietas recibidas posteriormente por las crías [21]. En humanos, un alto índice de masa corporal (IMC) en la madre está correlacionado con una menarquía temprana en sus hijas, sin embargo el alto IMC de las hijas no es suficiente para explicar este hecho [22].

Adicionalmente, ha sido demostrado que en ratas hijas de madres obesas existen cambios en la foliculogénesis [23], presentando un desarrollo folicular deficiente con una disminución en el número de folículos antrales junto a una disminución de la reserva folicular, además de la presencia de quistes ováricos [23, 24].

La pubertad prematura en crías de madres obesas resulta de alteraciones en los niveles de determinadas hormonas esteroideas sexuales, además de provocar desórdenes en la ciclicidad estral en la adultez [25, 26]. Esto coincide con los hallazgos de Ambrosetti y cols., en los cuales se evidenciaron altos niveles de estradiol y bajos niveles de testosterona en crías de madres obesas en comparación con las crías de madres control desde el día posnatal 1 hasta la adultez (DPN 60) respecto de las crías control [23].

Más aún, el modelo de obesidad materna inducido por dieta alta en grasa provoca efectos similares a los observados en modelos de estrogenización neonatal, en donde se han observado efectos como apertura vaginal adelantada debido a la exposición temprana a estradiol [27, 28]. Considerando la similitud de los efectos de la estrogenización neonatal con la obesidad materna y sus consecuencias en la función reproductiva de las crías femeninas, es posible que una alteración hormonal producto de la obesidad materna influya negativamente el microambiente uterino lo cual podría tener consecuencias a largo plazo en la cría hembra y finalmente provocar alteraciones en los niveles de hormonas esteroideas sexuales en la descendencia y más en detalle, alteraciones a nivel de esteroidogénesis en sus crías.

Obesidad y esteroidogénesis

La obesidad gestacional posee un importante impacto en la biosíntesis de hormonas sexuales en la descendencia; dentro de esto destaca en modelos animales el aumento de los niveles séricos de estradiol [26] junto con una disminución en los niveles de testosterona [29].

Esteroidogénesis: puntos clave

El transporte de colesterol desde la membrana externa de la mitocondria hacia su membrana interna es un paso limitante para el comienzo de la esteroidogénesis [30] y la proteína STAR (steroidogenic-acute-regulatory-protein) es el principal transportador encargado de esta función

[31]. A su vez, este transporte de colesterol facilitado por STAR otorga el sustrato necesario para la síntesis de pregnenolona desde colesterol, reacción catalizada por la enzima CYP450SCC (cholesterol-side-chain-cleavage-enzyme), codificada por el gen *Cyp11a1* [31], que es el paso límite en la velocidad de la vía esteroidogénica. La transcripción de *Cyp11a1* determina la expresión CYP450SCC, y su expresión determina la capacidad esteroidogénica de una célula proporcionando pregnenolona para dar comienzo a la esteroidogénesis [32, 33]. Luego, la enzima 3 β - Hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD) se encarga de catalizar la conversión de pregnenolona a progesterona [34]. La enzima citocromo p450 aromatasa es una enzima codificada por el gen *Cyp19a1*, la cual se expresa en diversos tejidos (placenta, tejido adiposo, cerebro, hueso, ovario, entre otros) y es la responsable de catalizar la conversión de andrógenos como la testosterona a estrógenos [35].

En modelos experimentales la obesidad afecta negativamente la función reproductiva, existiendo desregulación en la ciclicidad estral, como consecuencia de un desbalance hormonal [36, 37]. Más aun, la obesidad materna ha demostrado afectar de igual forma la función reproductiva de las crías causando desde alteraciones en el desarrollo folicular [24, 38] hasta provocar un desbalance hormonal [23]. En este sentido, es interesante estudiar si la obesidad materna predispone a la descendencia a un incremento en los componentes reguladores de la esteroidogénesis previamente mencionados.

Metformina y esteroidogénesis

La metformina es un derivado de biguanida (1,1-dimetilbiguanida). La metformina es el fármaco más prescrito para tratar la hiperglicemia en personas con Diabetes Mellitus tipo 2 [39] debido a su capacidad para inhibir la gluconeogénesis hepática, mejorar la sensibilidad a la acción de insulina y normalizar los niveles plasmáticos de glucosa [40], pero también se utiliza en otras patologías, como por ejemplo, el Síndrome de Ovario Poliquistico (PCOS) el cual es caracterizado por hiperandrogenismo, resistencia a la insulina, irregularidad menstrual e infertilidad [41]. La metformina incrementa la ovulación, mejora la ciclicidad menstrual en las mujeres con PCOS, además reduce los niveles séricos de andrógenos característicamente elevados en estas pacientes [42]. Estos efectos inhibitorios en la producción de andrógenos son atribuidos principalmente a la

reducción de la insulina plasmática, sin embargo, esto no es suficiente para explicar la mejora en la función reproductiva de las mujeres con dicho síndrome. Si bien, en este estudio no se evaluará la patología de PCOS como tal, se establece la relación entre este síndrome y las mejoras que conlleva la administración de metformina considerando que los modelos experimentales con obesidad inducida por una dieta alta en grasa tienden a presentar características similares a los modelos de PCOS como lo son la hiperinsulinemia y las alteraciones en la función reproductiva [15].

Estudios *in vitro* han demostrado que metformina es capaz de inhibir la actividad y expresión de la enzima aromatasa [43]: al inducir la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) que puede potencialmente causar una inhibición en la expresión de dicha enzima esteroideogénica [44]. Adicionalmente, metformina inhibe la conversión de testosterona y androstenediona a estradiol en células de la granulosa, siendo este efecto dosis dependiente (desde $10^{-7}M$ hasta $10^{-4}M$) [45].

Se ha demostrado que la administración prenatal de metformina tiene un impacto en el fenotipo metabólico de la descendencia en modelos animales [46]; esto pone en evidencia que a pesar de que el periodo de exposición solo sea a nivel gestacional, parece ser suficiente para que metformina afecte el fenotipo en la adultez de la descendencia. Ante este hallazgo es posible hipotetizar que la exposición prenatal a metformina podría eventualmente programar cambios en la descendencia en cuanto a su función reproductiva.

Considerando la influencia de metformina sobre la actividad y expresión de aromatasa es probable que este medicamento pueda afectar otros mediadores clave en la síntesis de hormonas esteroidales como STAR, CYP450SCC, 3β HSD inhibiendo su expresión génica, lo cual podría resultar en un beneficio si dichos mediadores a su vez resultan ser sobreexpresados en la descendencia producto de obesidad materna en el periodo gestacional. El laboratorio de alteraciones reproductivas y metabólicas de la Universidad de Valparaíso ha observado que el tratamiento con metformina durante el periodo perigestacional resulta en una modificación de los niveles de hormonas esteroidales (elevación de estradiol y disminución de testosterona) en la descendencia femenina [47]. Ante esto, determinar los mecanismos mediante los cuales dichos

cambios son obtenidos puede ayudar a dilucidar los efectos a largo plazo de la administración de metformina durante el embarazo. Estos antecedentes llevan a plantear la siguiente hipótesis:

Hipótesis

El tratamiento con metformina previo y durante la preñez en ratas gestantes obesas previene las alteraciones en la esteroidogénesis ovárica inducidas por la obesidad, resultando en una disminución de la concentración de hormonas sexuales en la descendencia femenina en la adultez.

Objetivo general

Determinar el efecto del tratamiento con metformina en madres gestantes con obesidad sobre la expresión de enzimas clave en la esteroidogénesis y de los niveles de hormonas sexuales en la descendencia femenina.

Objetivos específicos

1. Determinar la expresión transcripcional ovárica de *Star*, *Cyp11a1*, *Hsd3b2* y *Cyp19a1* en el ovario de ratas hembras descendientes de madres obesas y controles con y sin administración de metformina previo y durante la preñez y lactancia, al día post natal (DPN) 60 mediante RT-PCR en tiempo real.
2. Determinar la expresión proteica de la enzima CYP450SCC en el ovario de la descendencia femenina de ratas madres obesas y controles con y sin administración de metformina previo y durante la preñez y lactancia, al día post natal (DPN) 60 mediante Western Blot.
3. Determinar los niveles séricos de progesterona, testosterona y estradiol en ratas hembras descendientes de madres obesas y controles con y sin administración de metformina previo y durante la preñez y lactancia, al día post natal (DPN) 60 mediante ELISA.

Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron muestras almacenadas correspondientes al proyecto FONDECYT 11130707 cuyo investigador responsable es el Profesor Dr. Gonzalo Cruz Neculpán. En este proyecto se utilizaron 20 ratas hembras de cepa Sprague Dawley y los tejidos de su descendencia femenina. Los animales fueron alojados en la sala de mantención de animales del Instituto de Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso junto con la descendencia femenina de cada grupo. Todos los procedimientos experimentales han sido aprobados por el comité de Bioética de la Universidad de Valparaíso (CIBICA) y el comité de Bioética de la Comisión Nacional de Investigación, Ciencia y Tecnología (CONICYT).

Diseño Experimental

Las ratas permanecieron en un ambiente con temperatura controlada (20-22°C), con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas. Se alimentaron con una dieta control (Labdiet® 23% Proteína, 64% Hidratos de Carbono, 13% Lípidos, equivalentes a 4 Kcal/g) o dieta alta en grasas (High Fat: HF, ResearchDiet™ USA; 20% Proteína, 20% Hidratos de Carbono y 60% Lípidos, equivalentes a 5 Kcal/g) y agua ad libitum. Todas las ratas descendientes fueron alimentadas con dieta control desde el momento del destete.

Las ratas designadas para cruce fueron aclimatadas a las condiciones experimentales con dieta control por 3 semanas. Se registró permanentemente el peso corporal, ingesta alimentaria y ciclicidad estral mediante frotis vaginal. Desde la tercera semana, las ratas fueron divididas aleatoriamente en dos grupos (n=10) según el alimento ingerido, dieta control (Control) o dieta alta en grasa (HF), manteniéndose la dieta administrada a las ratas madres hasta el destete que corresponde el día postnatal (DPN) 21 de sus crías. Previo al periodo de cruce, las ratas fueron reagrupadas en 4 subgrupos: Control, Control Met, HF, HF Met (n=5 cada grupo); de los cuales Control Met y HF Met fueron los grupos de ratas tratadas con metformina. Las ratas fueron cruzadas después de 4 semanas de dieta control o dieta alta en grasa con machos reproductores de fertilidad probada alimentados con dieta control. La confirmación de la preñez se realizó

mediante la observación de espermatozoides en el canal vaginal mediante frotis vaginal o la observación de ocho diestros consecutivos. Las crías obtenidas de cada grupo fueron sexadas al DPN 1 mediante observación genital. Posterior al periodo de destete (DPN 21), las crías fueron separadas de sus madres y se mantuvieron con una dieta control. Posteriormente las crías fueron sacrificadas mediante decapitación cervical al DPN 60. Al momento de la eutanasia, se recolectaron 2 muestras de sangre troncal junto con los ovarios izquierdo y derecho; todas las muestras fueron almacenadas a -80°C . Los procedimientos de eutanasia de los animales de experimentación fueron realizados por personal capacitado en bioética y manejo de animales de experimentación.

Las abreviaturas Control, Control Met, HF, HF Met, serán utilizadas a continuación para hacer referencia a los grupos de crías cuyas madres recibieron los tratamientos previamente mencionados durante el periodo gestacional y perigestacional.

Tratamiento con metformina

Para los grupos de ratas madres tratadas con metformina, una semana antes de iniciar el periodo de cruce se comenzó con el tratamiento, el cual se mantuvo hasta el día DPN 14 del periodo de lactancia de las crías. Se administró metformina clorhidrato 250 mg/Kg peso/día (metformina clorhidrato en polvo, Farmacias Ecovital) según la dosis terapéutica en ratas [48], la cual fue disuelta en un vehículo comestible (jalea). Los grupos de madres no tratadas con metformina (Control y HF) recibieron igualmente jalea pero sin el medicamento.

Extracción y cuantificación de RNA.

Se pesó una mitad del ovario para ser homogenizada con reactivo TRizol® (Molecular Research Center, Inc; USA). El protocolo consiste en adicionar 1 mL del reactivo por cada 50-100 mg de tejido. Debido a que los pesos de los ovarios fueron menores a 25 mg se utilizó la mitad del volumen para todos los solventes requeridos. La homogenización vidrio - plástico se realizó bajo campana de extracción. La fase de separación consistió en agregar 200 μL de cloroformo al homogenizado, agitar por 15 seg e incubar a T° ambiente por 2-3 min, posteriormente se centrifugó a 12.000 g por 15 min a 4°C . La fase acuosa (la cual contiene el ARN) fue traspasada a un nuevo

tubo y se procedió a la etapa de precipitación con 250 μ L de isopropanol 100% a T° ambiente por 10 min y se centrifugó a 12.000 g por 10 min a 4°C. La fase de lavado consistió en eliminar el sobrenadante y adicionar 500 μ L de etanol 75%, se agitó en vortex y se centrifugó a 7.500 g por 5 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet por 10 min. Finalmente, la resuspensión del pellet consistió en adicionar 25 μ L de agua libre de ARNasa. La cuantificación fue realizada en un espectrofotómetro de microplaca (Epoch Biotek instrument Inc; USA). La pureza establecida por el cociente de absorbancia a 260/280 se encontró dentro del rango 1,8-2,0 para cada una de las muestras.

La integridad del ARN obtenido fue evaluada mediante la electroforesis en gel de agarosa en condiciones denaturantes. Para preparar la matriz se suspendió agarosa, previamente pesada, en buffer TBE 1X para obtener agarosa al 1%. La mezcla fue calentada y luego se deja enfriar por 5 min hasta los 60 °C y se añadió Safeview (NBS biologicals, UK). Posteriormente se cargó el gel en la cámara, se colocan las peinetas, se agrega TBE 1X y se esperara hasta solidificar.

Previo a la fase de sembrado, las muestras se someten a 70°C por 15 min en el termociclador (LifeEco Thermalcycler Bioer Technology). Una vez preparadas, se sembraron 3 μ L de muestra y 2 μ L de Buffer de carga 6X (New England Biolabs®) se dejó migrar a 100 V durante 30 min.

Finalmente pasado los 30 min, el gel se visualiza en el sistema de captura EpiChemi3 Darkroom.

Determinación de los niveles séricos de progesterona, testosterona y estradiol por Inmuno-ensayo ligado a enzima (ELISA)

La sangre troncal se obtuvo al momento de la eutanasia (1mL), sin anticoagulantes. El suero fue separado de los elementos figurados por centrifugación a 1.500 g por 10 min y almacenado a -20°C para su posterior análisis.

La concentración de hormonas en el suero fue determinada mediante un kit comercial de ELISA competitivo para estradiol (AlpcoDiagnostic, USA Cat. n° 11-ESTHU-E01), testosterona (AlpcoDiagnostic, USACat. n° 11-TESTHU-E01) y progesterona (AlpcoDiagnostic, USA Cat. n° 11-PROHU-E01) de acuerdo con las instrucciones especificadas por el fabricante.

Error intra-ensayo e inter-ensayo de cada kit son señalados en anexo 2.

Cuantificación relativa de la expresión de *Star*, *Cyp11a1*, *Hsd3b2* y *Cyp19a1* por RT-PCR en tiempo real

El ARN extraído de las muestras de ovario fue sometido a la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real acoplada a transcripción reversa (RT-qPCR). En breve, 1,4 µg de ARN de cada muestra se sometieron a la reacción de transcripción reversa para la obtención del ADNc en un termociclador (LifeEco Thermalcycler Bioer Technology). Para la reacción se utilizó SuperScript II (Invitrogen™,USA), random primers 3µg/µL (Invitrogen™, Usa), RNaseOUT, (Invitrogen™,USA) y dNTP's (Omega Bio-Tek,Inc; Georgia), DTT y agua libre de nucleasas. Posteriormente los ADNc se amplificaron mediante la PCR en tiempo real en presencia de partidores específicos para cada uno de los genes de interés. Los partidores fueron obtenidos según la base de datos "PrimerBank" [49] (partidores Tabla1).

Las muestras fueron analizadas por duplicado en un volumen de 10 µL: 2 µL de muestra + 0,5 µM partidador sentido + 0,5 µM partidador antisentido + 5 µL 2X Brilliant Platinum SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies)+ 2µL agua libre de ARNasa. La temperatura de alineamiento se muestra en la Tabla 2. Se realizó un protocolo de amplificación de 45 ciclos para todos los genes analizados. Para la normalización de los datos se utilizó el gen constitutivo *Gapdh*. Los datos fueron analizados acorde al método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [50].

Tabla 1. Características de los partidores utilizados

Partidor	Forward (5' – 3')	Reverse (5– 3')	Largo del amplicón (pares de bases)
<i>Star</i>	AGA TGA AGT GCT AAG TAA GGT GGT G	CCA GTT CTT CAT AGA GTC TGT CCA T	98
<i>Cyp11a1</i>	CAA CAT GGA GTC AGT TTA CA	GAC CCT CGC AGG AGA AGA GA	65
<i>Hsd3b2</i>	AGA CCA TCC TAG ATG TCA ATC TGA A	CAG GAT GAT CTT CTT GTA GGA GT	134
<i>Cyp19a1</i>	GCA CGA GAA TGG CAT CAT	GTT AGA AGT GTC CAG CAT G	220
<i>Gapdh</i>	GATGCCCCCATGTTTGTGAT	GGTCATGAGCCCTCCACAAT	151

Tabla 2. Condiciones de reacción de PCR para los distintos genes analizados.

Gen	Desnaturalización	Alineación	Elongación
<i>Star</i>	95°C x 20 s	60°C x 20 s	72°C x 20 s
<i>Cyp11a1</i>	95°C x 10 s	56°C x 15 s	72°C x 20 s
<i>Hsd3b2</i>	95°C x 20 s	60°C x 20 s	72°C x 30 s
<i>Cyp19a1</i>	95°C x 20 s	56°C x 20 s	72°C x 30 s
<i>Gapdh</i>	95°C x 20 s	60°C x 20 s	72°C x 30 s

Extracción de proteínas de tejido ovárico

Se utilizó la mitad del tejido ovárico previamente almacenado a -80°C para la extracción de proteínas. Se pesó, aproximadamente 20 mg de tejido el cual fue homogenizado en un homogenizador vidrio-plástico con buffer de lisis RIPA: 50 mM de Tris HCl pH 8, 150 mM de NaCl, 1% de NP-40, 0,1% de SDS, 2 mM de EDTA pH 7,4 y 1,5 mM de PMSF en presencia de inhibidor de proteasas (Promega®, USA). Todo el proceso fue realizado en hielo. El volumen de buffer RIPA utilizado fue 10 veces el volumen del tejido. El homogenizado fue centrifugado a 18.928 g durante 10 min, se recuperó el sobrenadante el cual fue almacenado a -20°C para su posterior cuantificación.

Cuantificación de proteínas

Una alícuota de 2 µL de las muestras extraídas en RIPA se cuantificaron directamente a una longitud de onda de 280 nm en un espectrofotómetro de microplaca (Epoch Biotek™).

Determinación de la expresión proteica de la enzima CYP450SCC mediante Western blot.

Para esta determinación se utilizaron las proteínas extraídas previamente del tejido ovárico.

La separación de proteínas totales fue realizada en condiciones denaturantes en gel de SDS-poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE). Se cargaron 45 µg de proteínas por pocillo, las cuales migraron en un campo eléctrico de 80 V por 15 min seguido de 100 V durante 3 h. La electrotransferencia de proteínas a una membrana de nitrocelulosa se realizó por 2 h a 350 mA.

Las membranas fueron bloqueadas con leche al 5% en solución 0,1% TBS-T (tris-buffered saline – 0.1% tween20) por 1 h en agitación. La incubación fue realizada con el anticuerpo primario anti-CYP450SCC (1:1.000, abcam) durante toda la noche a 4°C o el anticuerpo anti-GAPDH (1:40.000, Sigma-Aldrich). El anticuerpo secundario utilizado fue el Anti-Rabbit IgG conjugado a peroxidasa (Cell SignalingTechnology) a una concentración de 1:10.000 durante una hora a temperatura ambiente. Para la detección de los complejos inmunes se utilizó el sustrato quimioluminiscente Supersignal® West Dura (ThermoScientific) en el sistema de captura EpiChemi3 Darkroom. Para la cuantificación se contabilizaron los píxeles por banda en el programa ImageJ® (NIH).

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante el software GraphPadPrism® (San Diego, CA, USA), versión 6.01. Los resultados obtenidos fueron expresados como promedio, considerando su error estándar de la media correspondiente (EEM).

La distribución de los resultados fue analizada mediante el test de normalidad de D'Agostino – Pearson. De resultar normales se utilizó la prueba one – way anova con el objeto de evaluar diferencias significativas entre las medias experimentales. El nivel de significancia de $p < 0,05$ se seleccionó para indicar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales.

Resultados

Concentración sérica de progesterona, testosterona y estradiol.

En la figura 1 se muestran los valores de concentración sérica de las hormonas esteroidales progesterona, testosterona y estradiol en las crías de madres Control (alimentadas con dieta control), Control Met (alimentadas con dieta control, tratadas con metformina), HF (alimentadas con dieta alta en grasa) y HF Met (Alimentadas con dieta alta en grasa, tratadas con metformina).

No se encontraron diferencias significativas en los niveles séricos de progesterona para ninguno de los grupos analizados. Se encontró una disminución en los niveles séricos de testosterona en los grupos Control Met, HF, HF Met con respecto al grupo Control (Figura 1B).

Además, se encontró una disminución y una tendencia a la baja en los niveles séricos de estradiol para los grupos HF y HF Met, respectivamente, con respecto al grupo control (Figura 1C).

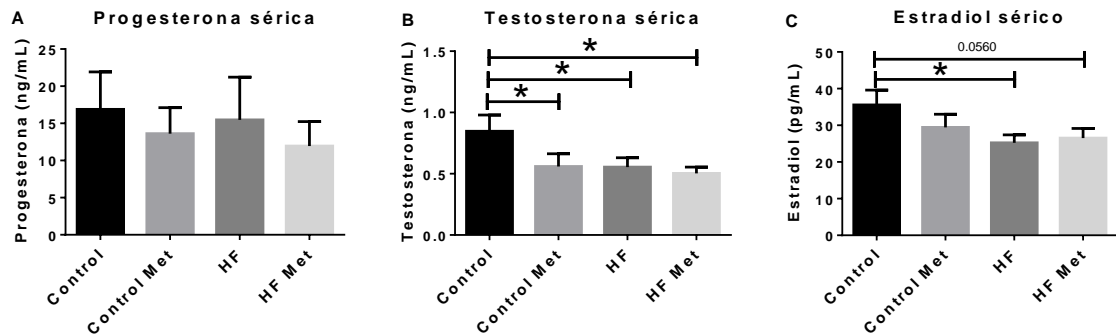


Figura 1: Niveles séricos de hormonas esteroidales. En la figura 1A se muestran los niveles séricos de progesterona (Control n=10, Control Met n=10, HF n=7, HF Met n=7), en la figura 1B se muestra los niveles séricos de testosterona (Control n=9, Control Met n=10, HF n=10, HF Met n=9) y en la figura 1C se muestran los niveles séricos de estradiol (control n=9, Control Met n=10, HF n=10, HF Met n=10) en ratas hijas de madres obesas a los 60 días de edad. Los datos se representan como la media \pm EEM. Los datos se distribuyen de forma normal. *P<0,05.

Expresión génica de la proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis (*Star*)

En la figura 2 se muestran los niveles de mRNA de *Star* en el ovario de ratas hijas de madres Control (alimentadas con dieta control), Control Met (alimentadas con dieta control, tratadas con metformina), HF (alimentadas con dieta alta en grasa) y HF Met (alimentadas con dieta alta en grasa, tratadas con metformina).

Se encontró un aumento significativo en la expresión de *Star* para el grupo Control Met y HF Met en comparación con el grupo control. También se encontró una tendencia al aumento en la expresión de *Star* en el grupo HF Met en comparación al grupo HF.

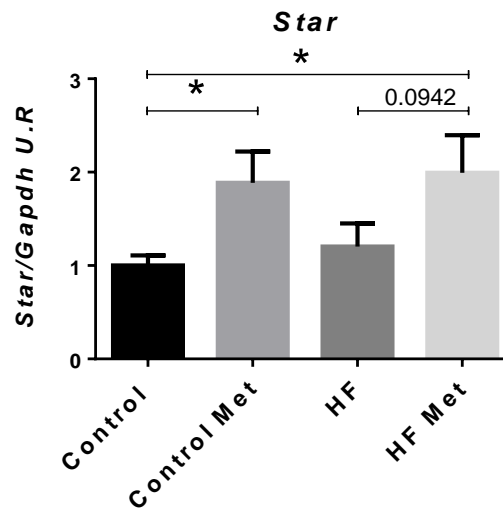


Figura 2. Niveles de mRNA de *Star*. En la figura se muestran los niveles de mRNA de *Star* (control n=6, Control Met n=7, HF n=5, HF Met n=5). En el eje de las ordenadas se representa el resultado de la normalización de los datos con la técnica delta delta CT con respecto al control. Los datos se representan como la media \pm EEM. Los datos se distribuyen de forma normal. *P<0,05 vs Control.

Expresión génica de la enzima CYP450SCC (*Cyp11a1*)

A continuación, en la figura 3 se muestran los niveles de mRNA del gen *Cyp11a1* en el ovario ratas hijas de madres Control (alimentadas con dieta control), Control Met (alimentadas con dieta control, tratadas con metformina), HF (alimentadas con dieta alta en grasa) y HF Met (alimentadas con dieta alta en grasa, tratadas con metformina).

El gen *Cyp11a1* codifica para la enzima CYP450SCC, la cual participa en la conversión de colesterol a pregnenolona, siendo el primer paso en la vía de síntesis de esteroides.

Se encontró un aumento significativo en la expresión de *Cyp11a1* para el grupo Control Met, HF y HF Met en comparación con el grupo control.

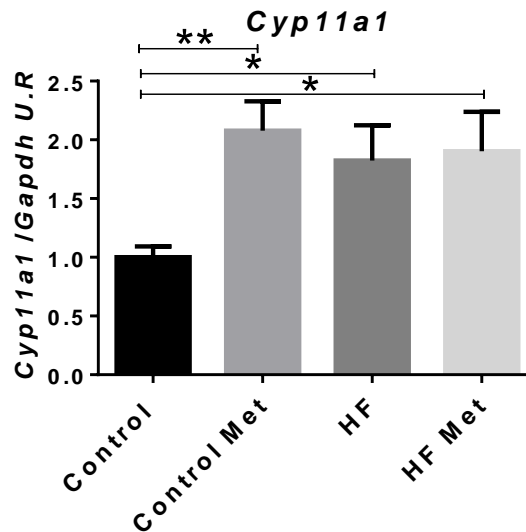


Figura 3. Niveles de mRNA de *Cyp11a1*. En la figura se muestran los niveles de mRNA de *Cyp11a1* (Control n=5, Control Met n=5, HF n=4, HF Met n=4). En el eje de las ordenadas se representa el resultado de la normalización de los datos con la técnica delta delta CT con respecto al control. Los datos se representan como la media \pm EEM. Los datos se distribuyen de forma normal. *P<0,05 vs Control.

Expresión génica de la enzima 3 β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa (*Hsd3b2*)

A continuación, en la figura 4 se muestran los niveles de mRNA del gen *Hsd3b2* en el ovario de las crías de madres Control (alimentadas con dieta control), Control Met (alimentadas con dieta control, tratadas con metformina), HF (alimentadas con dieta alta en grasa) y HF Met (alimentadas con dieta alta en grasa, tratadas con metformina).

El gen *Hsd3b2* codifica para la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, la cual participa en la conversión de pregnenolona a progesterona en el ovario.

No se encontraron diferencias significativas para ninguno de los grupos experimentales.

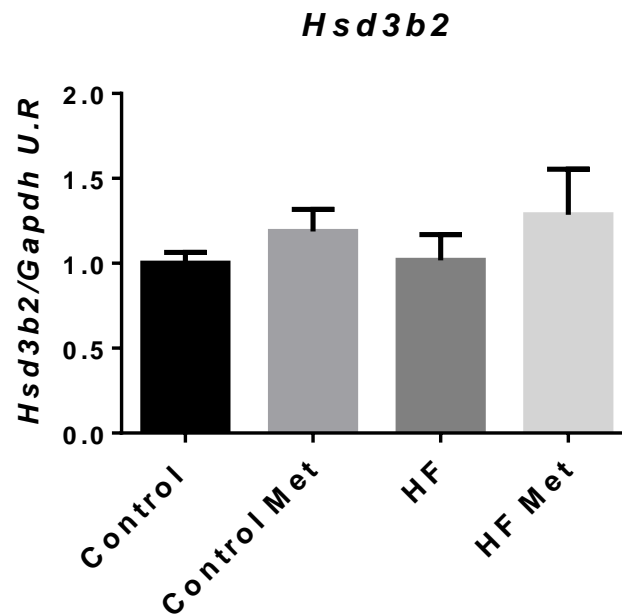


Figura 4. Niveles de mRNA de *Hsd3b2*. En la figura se muestran los niveles de mRNA de *Hsd3b2* (Control n=6, Control Met n=7, HF n=5, HF Met n=5). En el eje de las ordenadas se representa el resultado de la normalización de los datos con la técnica delta delta CT con respecto al control. Los datos se representan como la media \pm EEM. Los datos se distribuyen de forma normal. *=P<0,05 vs Control.

Expresión génica de la enzima Aromatasa (*Cyp19a1*)

A continuación, en la figura 5 se muestran los niveles de mRNA de *Cyp19a1* en el ovario de las crías de madres Control (alimentadas con dieta control), Control Met (alimentadas con dieta control, tratadas con metformina), HF (alimentadas con dieta alta en grasa) y HF Met (alimentadas con dieta alta en grasa, tratadas con metformina).

El gen *Cyp19a1* codifica para la enzima aromatasa que es la encargada de catalizar la biosíntesis de los estrógenos: estrona y estradiol a partir de los andrógenos testosterona y androstenediona.

Se encontró un aumento significativo en la expresión de *Cyp19a1* para el grupo HF Met en comparación con el grupo control y el grupo HF. No se encontraron diferencias significativas para el grupo Control Met.

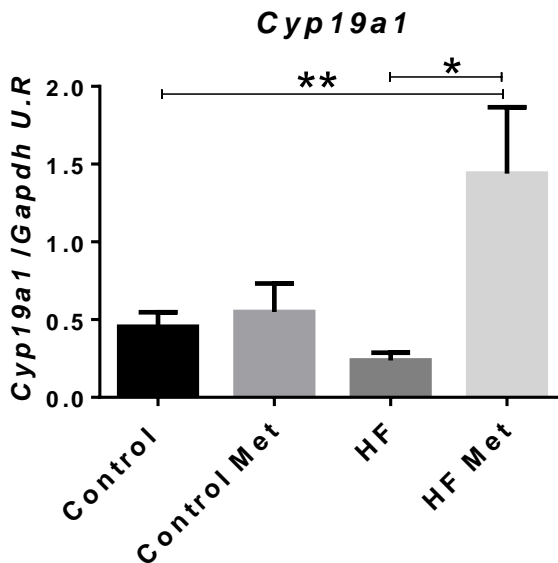


Figura 5. Niveles de mRNA de *Cyp19a1*. En la figura se muestran los niveles de mRNA de *Cyp19a1* (Control n=5, Control Met n=5, HF n=4, HF Met n=4). En el eje de las ordenadas se representa el resultado de la normalización de los datos con la técnica delta delta CT con respecto al control. Los datos se representan como la media \pm EEM. Los datos se distribuyen de forma normal. *P<0,05 vs Control.

Expresión proteica de la enzima CYP450SCC.

A continuación, en la Figura 6 se muestran los niveles de expresión de la proteína CYP450SCC evaluados por Western blot y normalizados con la proteína GAPDH en el ovario de ratas hijas de madres Control (alimentadas con dieta control), Control Met (alimentadas con dieta control, tratadas con metformina), HF (alimentadas con dieta alta en grasa) y HF Met (Alimentadas con dieta alta en grasa, tratadas con metformina).

Se encontró una tendencia al aumento de esta enzima en el grupo Control Met en comparación al grupo control.

Se encontró un aumento significativo en el grupo HF respecto al grupo control.

No se encontraron diferencias significativas en el grupo HF Met respecto del grupo control o HF.

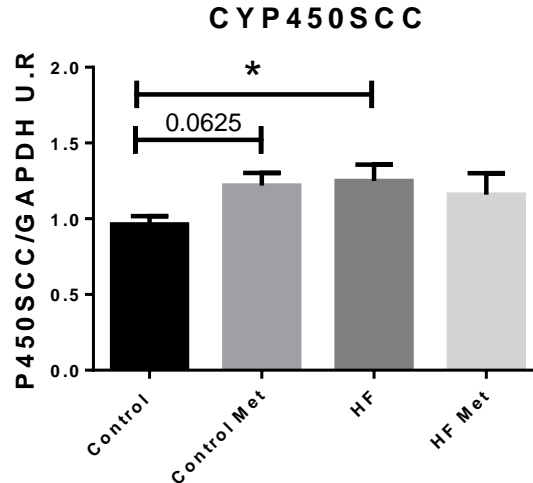


Figura 6. Expresión proteica de enzima CYP450SCC. En la figura 6 se muestran los niveles proteicos de CYP450SCC (control n=7, Control Met n=7, HF n=7, HF Met n=5). Los datos se representan como la media \pm EEM. Los datos se distribuyen de forma normal. *= $P < 0,05$ vs Control.

Discusión

En el laboratorio de alteraciones reproductivas y metabólicas, donde se realizó esta tesis, se ha demostrado con anterioridad que la obesidad materna provocada por la ingesta de una dieta alta en grasas, afecta parámetros reproductivos tales como los niveles de hormonas esteroidales (estradiol, testosterona) [29] además de producir alteraciones de metabolismo hormonal [51].

Como resultado de la obesidad materna durante el periodo gestacional, se ha reportado un aumento en los niveles séricos de estradiol en la crías [23]. A su vez, un aumento en los niveles séricos de hormonas esteroideas en la hembra puede alterar la función reproductiva, causando alteraciones como ciclos estrales erráticos [37], inicio precoz de la pubertad y un desarrollo folicular alterado [23, 24, 27] lo cual sugiere una disfunción ovárica en las crías como consecuencia de la obesidad materna.

Mediante este trabajo, se investigó si la administración de metformina en las madres durante el periodo gestacional y hasta la lactancia logra evitar las alteraciones deletéreas provocadas por la obesidad gestacional sobre la función reproductiva de descendencia femenina. Se esperaba observar una mejora en el perfil de expresión génica y proteica de enzimas implicadas en la esteroidogénesis ovárica como también en los niveles séricos de hormonas esteroidales previamente mencionadas.

Niveles séricos de progesterona, testosterona y estradiol en ratas hijas de madres obesas y su relación con metformina.

Estudios previos [43, 45, 52] señalan la influencia que tiene la administración de metformina en la síntesis de hormonas esteroideas. Metformina inhibe la expresión además de actividad de enzimas esteroidogénicas como por ejemplo la enzima 17 α -hidroxilasa (CYP17A1), que cataliza la síntesis de andrógenos [53]. También inhibe la expresión del transportador STAR [52, 53]. Ambos efectos llevan a una disminución en la producción de andrógenos [42].

Si bien los efectos inhibitorios previamente mencionados se basan en la aplicación directa de metformina al modelo experimental utilizado, en este trabajo se investigó si la administración materna de metformina en el periodo perigestacional puede llegar a ejercer un efecto similar en

cuanto a la expresión génica de mediadores esteroideogénicos en la cría en formación y así prevenir los efectos deletéreos de la obesidad materna en la función reproductiva de la cría en la adultez.

A pesar de que no se observaron diferencias significativas para las concentraciones séricas de progesterona, si es posible encontrar una disminución en los niveles séricos de testosterona en los grupos Control Met, HF y HF Met respecto al grupo Control. Para los grupos Control Met y HF Met, esto podría explicarse debido a la capacidad por parte de metformina para inhibir la expresión de la enzima involucrada en la síntesis de andrógenos, 17 α -hidroxilasa (CYP17A1) [53]; sin embargo, teniendo en consideración que el único periodo de exposición a metformina de la crías corresponde al periodo perigestacional y a su vez siendo este una ventana crítica en términos de programación [12], es posible que el embarazo en concomitancia con la administración de metformina contrariamente a causar una mejora en los niveles hormonales, afecte la manera en la que se expresan las enzimas involucradas en la síntesis de hormonas sexuales, lo cual lleva finalmente a una disminución de estas hormonas en la adultez de la cría independiente de la dieta administrada a la madre. Sería interesante conocer la expresión génica y proteica de la enzima CYP17A1 en la descendencia; de encontrarse disminuida corroboraría el hecho de que cambios epigenéticos provocados por metformina en el periodo gestacional provoca una menor expresión de la enzima encargada de la síntesis de andrógenos en la crías expuestas.

También es posible observar una disminución en los niveles de estradiol para el grupo HF y HF Met, respecto del grupo control. Esto está relacionado con la disminución de la concentración de andrógenos para los mismos grupos. Según la teoría de las 2 células [54] la síntesis ovárica de estrógenos está directamente influenciada por la síntesis de andrógenos en las células tecales, siendo estos últimos sustrato para la formación de estradiol y estrona. Si existe una menor disponibilidad de andrógenos en consecuencia habrá una menor producción de estradiol por parte de las células de la granulosa.

La disminución de las hormonas testosterona y estradiol es un patrón que se repite para los grupos de crías de madres alimentadas con dieta alta en grasa con y sin tratamiento con metformina HF Met y HF, respectivamente. La dieta alta en grasa en la madre afecta negativamente la función

reproductiva de la cría y dentro de estas alteraciones, se encontrarían la deficiencia en el desarrollo folicular [23, 24]. Es fundamental para el desarrollo saludable del ovario y su función en la vida adulta el establecimiento de un pool de folículos primordiales adecuado [38]. El número de folículos primordiales establecidos en la vida temprana (DPN 1 a 4 en ratas [55]) dicta el potencial reproductivo de la descendencia en la adultez. Se ha señalado que la exposición materna a una dieta alta en grasa causa una disminución en el número de folículos primordiales y antrales en la descendencia [24] mientras que otros autores señalan que fetos de madres alimentadas con dieta alta en grasa poseen un menor número de ovocitos [38]. El laboratorio de alteraciones reproductivas y metabólicas ha demostrado con anterioridad este hecho, al hallar un menor número de folículos antrales sanos [29] y un menor número de cuerpos lúteos en la descendencia femenina de madres obesas, lo que podría dar cuenta de un menor número de ovulaciones efectivas [47]. En este sentido lo más probable es que las crías de madres alimentadas con dieta alta en grasa con y sin tratamiento con metformina tengan un desarrollo folicular deficiente y esto sea una de la causa de las alteraciones en los niveles hormonales respecto del grupo control, por lo cual sería interesante realizar un análisis histológico para evaluar la morfología ovárica en los grupos en estudio y contrastarlo con los resultados de niveles hormonales obtenidos.

Los resultados obtenidos en el laboratorio de alteraciones reproductivas y metabólicas en series experimentales anteriores, han demostrado que en crías hembras de madres alimentadas con una dieta alta en grasa (HF) aumentan los niveles séricos de estradiol desde el DPN 1 hasta el DPN 60 [23]. Este resultado es contradictorio a lo hallado en este trabajo, en donde las crías de madres alimentadas con una dieta alta en grasa al DPN 60 poseen una disminución en los niveles séricos de estradiol respecto del grupo control. Si bien ambas series son similares (siendo evaluados los niveles de estradiol en ratas de la cepa Sprague Dawley crías de madres alimentadas con dieta alta en grasa), existen algunas diferencias que deben ser destacadas:

En la serie experimental anterior [23], las ratas control recibieron dieta *Control Champion S.A, Nutrición Animal, Santiago Chile*, mientras que en esta serie experimental las ratas control fueron alimentadas con dieta *Labdiet®* la cual es una dieta estandarizada para animales de experimentación (roedores), certificada respecto de la cantidad de nutrientes necesarios y niveles

de contaminantes dentro de rangos aceptables para garantizar que no existan interferencias entre la dieta y los resultados obtenidos.

La medición de estradiol para las crías de madres obesas y controles ocurre durante los DPN 1, 7, 14, 30 y 60 [23], en este trabajo solo se evaluó la concentración al DPN 60. En este punto, el trabajo anterior encuentra un aumento significativo en los niveles de estradiol en crías de madres obesas, sin embargo, a pesar de que esta diferencia es estadísticamente significativa el número de muestras para el grupo HF (HF n=4) es distinto al número de muestras utilizado para la determinación de estradiol al DPN 60 en esta serie experimental (HF n=10), por lo cual es posible que el aumento en el estradiol obtenido para el grupo HF al DPN 60 en trabajos anteriores no represente fisiológicamente lo que está ocurriendo para el grupo de crías de madres obesas.

Por otro lado, la serie experimental de trabajos anteriores poseía un compromiso de la función hepática [23, 51], en donde se evidenció una disminución en la expresión de la enzima hepática CYP3A2, la cual es responsable de la metabolización del estradiol, demostrando la disminución en el metabolismo de estradiol, lo cual explica los niveles séricos aumentados en esta serie. En este trabajo, no fue evaluada la expresión de la enzima CYP3A2 por lo cual no se puede asumir que su expresión se encuentre igualmente disminuida.

Finalmente, todas las ratas madres de esta serie experimental recibieron jalea, independientemente de los grupos en tratamiento con metformina. Dentro de la composición de la jalea administrada se encontraban edulcorantes (como sucralosa, acesulfamo-k y aspartamo) que experimentalmente han demostrado alterar la microbiota intestinal [56, 57], lo cual debe ser tomando en cuenta considerado la recirculación entero hepática del estradiol.

Expresión transcripcional ovárica de *Star*, *Cyp11a1*, *Hsd3b2* y *Cyp19a1* en crías hijas de madre obesas y su relación con metformina.

De manera similar a los resultados de hormonas séricas, la expresión transcripcional de *Star*, *Cyp11a1*, *Hsd3b2* y *Cyp19a1* ha resultado ser contraria a la esperada. Metformina no logra revertir los cambios ocasionados en la expresión génica para las hijas de madres tratadas con dieta alta en grasa; en su lugar, aumenta la expresión de dichos genes en comparación con el grupo control.

Se encontró un aumento significativo en la expresión de *Star* en el grupo de crías de madres alimentadas con una dieta alta en grasa y tratadas con metformina (HF Met) y en el grupo de crías hijas de madres alimentadas con dieta control y tratadas con metformina (Control Met) con respecto del grupo control. La proteína reguladora aguda esteroideogénica (steroidogenic acute regulatory protein) es clave en la síntesis de hormonas esteroideas, al facilitar el transporte de colesterol desde la membrana externa de la mitocondria hacia la membrana interna de la mitocondria y así proveer de sustrato a la enzima CYP450SCC siendo esta a su vez encargada de la síntesis de pregnenolona [31]. Experimentalmente se ha encontrado que metformina inhibe la expresión proteica de STAR en cultivos celulares de células ováricas tecaales [53]; sin embargo en este estudio metformina administrado durante el periodo perigestacional causa un aumento de la expresión del gen codificante para la proteína STAR en la adultez de las crías.

La expresión de *Cyp11a1* ha resultado en un aumento para los grupos Met, HF y HF Met respecto del grupo control. El gen *Cyp11a1* codifica para la enzima CYP450SCC la cual es limitante de la velocidad en la esteroideogénesis, dado a que genera el primer producto necesario para continuar la síntesis, la pregnenolona a partir de sustrato colesterol [31]. Existe un claro aumento de la expresión para el grupo HF y HF Met respecto del grupo control lo cual podría dar indicio de la implicancia de la dieta alta en grasa materna en la expresión de dicho gen; sin embargo, también se observa un aumento evidente en el grupo de crías cuyas madres fueron alimentadas con dieta control y que adicionalmente recibieron tratamiento con metformina (Control Met) que demuestra que metformina, independientemente de la dieta aumenta la expresión de *Cyp11a1*.

No se observaron cambios en la expresión de *Hsd3b2* en ninguno de los grupos en estudio. La enzima 3 β -HSD es la responsable de catalizar la conversión de sustrato pregnenolona a progesterona. Experimentalmente se ha demostrado que el tratamiento con metformina disminuye la producción de progesterona [58] además de causar inhibición de la expresión de *Hsd3b2* en líneas celulares esteroideogénicas [59], en este estudio no se observaron cambios significativos en la expresión génica de *Hsd3b2*, de igual forma que los resultados de niveles progesterona sérica. Una posible explicación a este suceso podría atribuirse al ciclo estral de la rata. En esta serie experimental todos los animales fueron sacrificados cercano al día post natal 60 mientras el animal

se encontraba en la etapa estro del ciclo estral. Se escoge esta etapa para realizar la eutanasia teniendo en consideración que los niveles hormonales del animal se encuentran, en general, en su estado basal lo cual supone de una menor variación en los posteriores análisis hormonales. No obstante, debe considerarse la variabilidad biológica en el animal lo cual tiene implicancias en la duración de cada etapa del ciclo estral. En este sentido y considerando que la etapa estro dura aproximadamente un día es posible que el animal se haya encontrado en estro tardío en que los niveles hormonales ya no se encuentran en estado basal [60].

La expresión de *Cyp19a1* ha resultado aumentada significativamente en los grupos HF Met en comparación con el grupo control y el grupo HF. La enzima aromatasa codificada por el gen *Cyp19a1* es la enzima esteroideogénica involucrada en la síntesis de estradiol y estrona a partir de andrógenos como sustrato. Estudios han demostrado la capacidad de metformina para inhibir la actividad y/o expresión de aromatasa en cultivos de células de la granulosa [45] además de disminuir la producción de estradiol [52]. La expresión de *Cyp19a1* aumenta significativamente en el grupo HF Met respecto del grupo control; sin embargo, la amplia variación estadística en este grupo no permite aseverar que efectivamente la expresión se encuentra aumentada, ante esto habría de aumentar el n para dicho grupo experimental y así comprobar de mejor forma como se comporta la expresión del gen junto con evaluar la expresión proteica o actividad enzimática de la CYP19A1 y así tener otro parámetro para contrastar la expresión génica y niveles hormonales.

Con los antecedentes mencionados, si bien era esperable encontrar una disminución en la expresión génica de enzimas esteroideogénicas clave para los grupos tratados con metformina nuevamente es importante considerar que la administración de metformina no es aplicada directamente en los grupos de estudio, sino a través de la madre, en el periodo gestacional y perigestacional de manera de que los efectos previamente vistos para metformina en dichos modelos no son del todo comparables con este estudio pues tanto la administración y el periodo de exposición son distintos.

Expresión proteica de la enzima CYP450SCC.

La expresión proteica de la enzima CYP450SCC resulta aumentada para el grupo HF además de observarse una tendencia al aumento en el grupo Control Met. Cabe destacar que la expresión

génica de *Cyp11a1* se correlaciona con este resultado para los mismos grupos. Sería interesante contrastar estos resultados con una evaluación de los niveles de pregnenolona, el producto de CYP450SCC, de manera de comprobar que el aumento en la expresión de esta enzima efectivamente aumenta la cantidad de este intermediario esteroidogénico.

Otros autores han demostrado que en PCOS existe un aumento en la expresión de *Cyp11a1* [61]. Lo cual podría sugerir, junto con las alteraciones de hormonas esteroidales, la existencia de un cambio en la población folicular como consecuencia de la dieta materna alta en grasa lo cual provoque finalmente la formación de quistes ováricos, siendo estos quistes responsables del aumento en la expresión enzimas esteroidogénicas como CYP450SCC y el transportador *Star* en los grupos HF.

Debe ser considerado que la expresión génica tanto de *Cyp11a1* como *Star* se encuentran bajo regulación de las hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH). En este sentido la estimulación con LH en células de la granulosa y teca aumenta los niveles de mRNA para *Cyp11a1* [62]. Así mismo, la expresión génica de *Star* resulta aumentada frente al mismo estímulo con LH en el ovario de rata [63]. Las gonadotropinas LH y FSH, ejercen su efecto al unirse al su receptor de membrana acoplado a proteína Gs, lo que lleva un aumento en la formación de AMPc, intermediario que activa la proteína kinasa A (PKA) la cual fosforila factores de transcripción como CREB que permitan la expresión génica, en este caso, *Cyp11a1* y *Star* [64, 65].

Los estrógenos, ejercen un feedback negativo en la liberación de LH y FSH [66], la concentración de estradiol esta disminuida para los grupos de crías HF y HF Met en comparación con el grupo control, lo cual implicaría un menor feedback negativo sobre el hipotálamo e hipofisis y un consecuente aumento en la concentración de LH. A su vez esto podría implicar una sobreestimulación de LH en el ovario, lo cual explicaría el aumento en la expresión de *Cyp11a1* y *Star*. Sin embargo, LH también estimula directamente la producción de andrógenos [60, 67]. En este estudio los niveles de testosterona están disminuidos para los grupos HF y HF Met por lo cual, a pesar de existir un posible aumento de LH, puede que los niveles de testosterona obtenidos sean consecuencia una alteración en la actividad y/o expresión de la enzima CYP17A1, responsable de su síntesis. En este contexto sería interesante conocer los niveles séricos de LH

para los grupos en estudios debido a su implicancia en la estimulación de la expresión génica de *Cyp11a1* y *Star*. Suponiendo que una alteración en la enzima CYP17A1 provoque una disminución de la producción de testosterona, sería necesario saber si se produce una acumulación del metabolito anterior, en este caso, androstenediona.

Ahora bien, el aumento en la expresión génica de *Cyp11a1* y *Star* y proteica de CYP450SCC para los grupos de crías cuyas madres fueron tratadas con metformina, puede ser inherente al efecto que metformina tiene en el metabolismo de la madre. Los efectos benéficos de metformina son explicados debido a su mecanismo de acción, la inhibición del complejo I de la cadena transportadora de electrones; esta inhibición provoca una disminución en la producción de ATP intracelular, lo que activa la proteína kinasa activada por AMP, AMPK (secundario a un aumento en la proporción AMP/ATP) [68, 69]. AMPK actúa como un sensor energético que activa vías catabólicas productoras de ATP, para normalizar la homeostasis energética en la célula [70]. Este estado de deprivación energética favorecido por metformina para la activación de vías catabólicas que proporcionen ATP, durante el embarazo puede ser sentido como un estado de subnutrición o desnutrición por el feto en formación. A su vez, esta alteración en el microambiente uterino puede llevar a la programación genética del feto lo cual como consecuencia en la adultez de la cría puede provocar alteraciones reproductivas. En otro estudio [46] se descubrió que la exposición de metformina en el embarazo resultó en una descendencia cuyo fenotipo se asimilaba al fenotipo de modelos experimentales de desnutrición materna. Es importante señalar esto debido a que el modelo de desnutrición materna (o restricción energética) igualmente presenta alteraciones deletéreas en la función reproductiva de sus crías [71], lo cual podría en este caso relacionarse con las alteraciones en la expresión de *Cyp11a1* y *Star* para los grupos de crías hijas de madres que recibieron dieta control y metformina durante el embarazo. Por lo cual sería importante realizar un análisis histológico de la población folicular de los grupos en estudio, en especial para el grupo Control Met de los cuales no se presentan análisis histológicos previos.

Conclusiones

- La obesidad materna disminuye los niveles de hormonas esteroidales testosterona y estradiol en la descendencia, respecto del grupo control. El tratamiento con metformina en el periodo gestacional no logra revertir este efecto para el grupo de crías de madres alimentadas con dieta HF, sin embargo, el tratamiento con metformina en crías de madres alimentadas con dieta control, disminuye de manera similar a los grupos HF la concentración de testosterona y estradiol.
- La expresión transcripcional ovárica de *Star* resulta aumentada para los grupos Control Met y HF Met y la expresión de *Cyp11a1* aumenta en los grupos Control Met, HF Y HF Met. El tratamiento con metformina durante la gestación parece aumentar la expresión de *Star*, contrariamente a lo esperado. La expresión de *Cyp11a1* aumenta para ambos grupos de crías de madres obesas (HF Y HF Met), y ante esto metformina no logra revertir dicho efecto sino que lo acentúa. La expresión de *Hsd3b2* permanece sin cambios para todos los grupos experimentales al igual que la expresión de *Cyp19a1*.
- La expresión proteica de la enzima CYP450SCC aumenta para los grupos Control Met y HF. Este resultado coincide con la expresión de *Cyp11a1*, su gen codificante, para los mismos grupos experimentales. Por lo cual la obesidad materna en el periodo gestacional aumenta la expresión proteica de CYP450SCC en la adultez de las crías hembras y el tratamiento con metformina parece no revertir este efecto. Más aun el tratamiento con metformina por si mismo aumenta la expresión proteica de CYP450SCC en la adultez de las crías hembras (Control Met).

Bibliografía

1. OMS. 2016. *Sobrepeso y Obesidad*. <http://www.who.int>. (última visita Julio, 2017).
2. Villalobos, J.C. *Obesity: the real pandemic of the 21st century*. *Cirugía y cirujanos*, 2016. p 351-355.
3. Alzeidan, R., et al., *Non-Communicable Disease Risk Factors among Employees and Their Families of a Saudi University: An Epidemiological Study*. *PLoS One*, 2016. **11**: p. 1-13.
4. Gobierno de Chile. 2010. *Indicadores de Obesidad En Población Chilena*. <http://www.minsal.gob.cl> (última visita Julio, 2017).
5. Garmendia, M.L., et al., *Association between prepregnancy obesity and metabolic risk in Chilean premenopausal women 10 y postpartum*. *Nutrition*, 2017. **38**: p. 20-27.
6. Gobierno de Chile. 2015. *Vigilancia del estado nutricional de la población bajo control y de la lactancia materna en el sistema público de salud de Chile*. <http://www.minsal.gob.cl> (última visita Julio, 2017).
7. Kapur, A., *Links between maternal health and NCDs*. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2015. **29**(1): p. 32-42.
8. Poston, L., et al., *Obesity in pregnancy: implications for the mother and lifelong health of the child. A consensus statement*. *Pediatr Res*, 2011. **69**(2): p. 175-180.
9. Simpson, E.R. and K.A. Brown, *Minireview: Obesity and breast cancer: a tale of inflammation and dysregulated metabolism*. *Mol Endocrinol*, 2013. **27**(5): p. 715-725.
10. Gluckman, P.D. and M.A. Hanson, *The developmental origins of the metabolic syndrome*. *Trends Endocrinol Metab*, 2004. **15**(4): p. 401-408.
11. Lucas, A., *Programming by early nutrition in man*. *Ciba Found Symp*, 1991: p. 38-50.
12. Vieau, D., *Perinatal nutritional programming of health and metabolic adult disease*. *World J Diabetes*, 2011. **2**(9): p. 133-136.
13. Patti, M.E., *Intergenerational programming of metabolic disease: evidence from human populations and experimental animal models*. *Cell Mol Life Sci*, 2013. **70**(9): p. 1597-1608.
14. Mitchell, A. and H.C. Fantasia, *Understanding the Effect of Obesity on Fertility Among Reproductive-Age Women*. *Nurs Womens Health*, 2016. **20**(4): p. 368-376.

15. Roberts, J.S., et al., *High-fat high-sugar diet induces polycystic ovary syndrome in a rodent model*. Biol Reprod, 2017: p. 551-562.
16. Skaznik-Wikiel, M.E., et al., *High-Fat Diet Causes Subfertility and Compromised Ovarian Function Independent of Obesity in Mice*. Biol Reprod, 2016. **94**(5): p. 1-10.
17. Jungheim, E.S., et al., *Diet-induced obesity model: abnormal oocytes and persistent growth abnormalities in the offspring*. Endocrinology, 2010. **151**(8): p. 4039–4046
18. Wu, L.L., et al., *High-fat diet causes lipotoxicity responses in cumulus-oocyte complexes and decreased fertilization rates*. Endocrinology, 2010. **151**(11): p. 5438-5445.
19. Machtinger, R., et al., *The association between severe obesity and characteristics of failed fertilized oocytes*. Hum Reprod, 2012. **27**(11): p. 3198-3207.
20. Luzzo, K.M., et al., *High fat diet induced developmental defects in the mouse: oocyte meiotic aneuploidy and fetal growth retardation/brain defects*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e49217.
21. Sloboda, D.M., et al., *Pre- and postnatal nutritional histories influence reproductive maturation and ovarian function in the rat*. PLoS One, 2009. **4**(8): p. e6744.
22. Keim, S.A., et al., *Maternal body mass index and daughters' age at menarche*. Epidemiology, 2009. **20**(5): p. 677-681.
23. Ambrosetti, V., et al., *Increase in endogenous estradiol in the progeny of obese rats is associated with precocious puberty and altered follicular development in adulthood*. Endocrine, 2016. **53**(1): p. 258-270.
24. Cheong, Y., et al., *Diet-induced maternal obesity alters ovarian morphology and gene expression in the adult mouse offspring*. Fertil Steril, 2014. **102**(3): p. 899-907.
25. Connor, K.L., et al., *Nature, nurture or nutrition? Impact of maternal nutrition on maternal care, offspring development and reproductive function*. J Physiol, 2012. **590**(9): p. 2167-2180.
26. Lin, Y.J., et al., *Detrimental effect of maternal and post-weaning high-fat diet on the reproductive function in the adult female offspring rat: roles of insulin-like growth factor 2 and the ovarian circadian clock*. J Assist Reprod Genet, 2017. **34**(6): p. 817-826.
27. Cruz, G., et al., *Temporal window in which exposure to estradiol permanently modifies ovarian function causing polycystic ovary morphology in rats*. Fertil Steril, 2012. **98**(5): p. 1283-1290.

28. Shirota, M., et al., *Dose-dependent acceleration in the delayed effects of neonatal oral exposure to low-dose 17alpha-ethynylestradiol on reproductive functions in female Sprague-Dawley rats*. J Toxicol Sci, 2015. **40**(6): p. 727-738.
29. Ambrosetti V. y Guerra M. *Exposicion materna a una dieta alta en grasa previo y durante la preñez y la lactancia, y sus consecuencias en la funcion reproductiva de la descendencia. Tesis para optar al titulo de Licenciado en Nutricion y Dietetica. Universidad de Valparaiso Valparaiso, Chile. 2014.*
30. Li, J., et al., *De novo synthesis of steroids and oxysterols in adipocytes*. J Biol Chem, 2014. **289**(2): p. 747-764.
31. Miller, W.L., *StAR search--what we know about how the steroidogenic acute regulatory protein mediates mitochondrial cholesterol import*. Mol Endocrinol, 2007. **21**(3): p. 589-601.
32. Miller, W.L., *Steroidogenic enzymes*. Endocr Dev, 2008. **13**: p. 1-18.
33. Miller, W.L. and H.S. Bose, *Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking*. J Lipid Res, 2011. **52**(12): p. 2111-2135.
34. Bremer AA, Miller WL. 2014. Chapter 13: Regulation of Steroidogenesis, En: Cellular Endocrinology in Health and Disease. Academic press Elsevier Inc. P. 207-227.
35. Meinhardt, U. and P.E. Mullis, *The aromatase cytochrome P-450 and its clinical impact*. Horm Res, 2002. **57**(5-6): p. 145-152.
36. Hussain, M.A., et al., *Effect of feeding a high-fat diet independently of caloric intake on reproductive function in diet-induced obese female rats*. Arch Med Sci, 2016. **12**(4): p. 906-14.
37. Akamine, E.H., et al., *Obesity induced by high-fat diet promotes insulin resistance in the ovary*. J Endocrinol, 2010. **206**(1): p. 65-74.
38. Tsoulis, M.W., et al., *Maternal High-Fat Diet-Induced Loss of Fetal Oocytes Is Associated with Compromised Follicle Growth in Adult Rat Offspring*. Biol Reprod, 2016. **94**(4): p. 94.
39. Nathan, D.M., et al., *Medical management of hyperglycaemia in type 2 diabetes mellitus: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes*. Diabetologia, 2009. **52**(1): p. 17-30.
40. Rena, G., D.G. Hardie, and E.R. Pearson, *The mechanisms of action of metformin*. Diabetologia, 2017: p. 1577–1585.

41. Sam, S. and D.A. Ehrmann, *Metformin therapy for the reproductive and metabolic consequences of polycystic ovary syndrome*. *Diabetologia*, 2017: p. 1656–1661.
42. Tang, T., et al., *Insulin-sensitising drugs (metformin, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) for women with polycystic ovary syndrome, oligo amenorrhoea and subfertility*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2012(5): p. CD003053.
43. Rice, S., et al., *Dual effect of metformin on growth inhibition and oestradiol production in breast cancer cells*. *Int J Mol Med*, 2015. **35**(4): p. 1088-1094.
44. Brown, K.A., et al., *Metformin inhibits aromatase expression in human breast adipose stromal cells via stimulation of AMP-activated protein kinase*. *Breast Cancer Res Treat*, 2010. **123**(2): p. 591-596.
45. Rice, S., et al., *Metformin inhibits aromatase via an extracellular signal-regulated kinase-mediated pathway*. *Endocrinology*, 2009. **150**(10): p. 4794-4801.
46. Salomaki, H., et al., *Prenatal metformin exposure in mice programs the metabolic phenotype of the offspring during a high fat diet at adulthood*. *PLoS One*, 2013. **8**(2): p. e56594.
47. Alvarez, D y Olguin G. *Efectos del tratamiento con metformina previo y durante la preñez en ratas madres obesas sobre la función reproductiva de la descendencia femenina. Tesis para optar al título de Licenciado en Nutrición y Dietética. Universidad de Valparaiso.2015.*
48. Song, R., *Mechanism of Metformin: A Tale of Two Sites*. *Diabetes Care*, 2016. **39**(2): p. 187-189.
49. *Massachusetts General Hospital. 2006. PrimerBank: PCR Primers for Gene Expression Detection and Quantification. <https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/> (Ultima visita Septiembre, 2017).*
50. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-408.
51. 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 Licenciado en Nutricion y Dietetica. Universidad de Valparaiso Valparaiso, Chile. 2014.*
52. Mansfield, R., et al., *Metformin has direct effects on human ovarian steroidogenesis*. *Fertil Steril*, 2003. **79**(4): p. 956-962.
53. Attia, G.R., W.E. Rainey, and B.R. Carr, *Metformin directly inhibits androgen production in human thecal cells*. *Fertil Steril*, 2001. **76**(3): p. 517-524.

54. Erickson, G.F., *Physiologic basis of ovulation induction*. Semin Reprod Endocrinol, 1996. **14**(4): p. 287-297.
55. Skinner, M.K., *Regulation of primordial follicle assembly and development*. Hum Reprod Update, 2005. **11**(5): p. 461-471.
56. Uebanso, T., et al., *Effects of Low-Dose Non-Caloric Sweetener Consumption on Gut Microbiota in Mice*. Nutrients, 2017. **9**(6).
57. Bian, X., et al., *The artificial sweetener acesulfame potassium affects the gut microbiome and body weight gain in CD-1 mice*. PLoS One, 2017. **12**(6): p. e0178426.
58. Tosca, L., et al., *Metformin-induced stimulation of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase (PRKA) impairs progesterone secretion in rat granulosa cells*. Biol Reprod, 2006. **75**(3): p. 342-351.
59. Hirsch, A., et al., *Metformin inhibits human androgen production by regulating steroidogenic enzymes HSD3B2 and CYP17A1 and complex I activity of the respiratory chain*. Endocrinology, 2012. **153**(9): p. 4354-4366.
60. Freeman M. 2006. *Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the Rat. En: Physiology of reproduction. Elsevier Inc. Londres. p.2327-2407.*
61. Wood, J.R., et al., *The molecular signature of polycystic ovary syndrome (PCOS) theca cells defined by gene expression profiling*. J Reprod Immunol, 2004. **63**(1): p. 51-60.
62. Goldring, N.B., et al., *Cholesterol side-chain cleavage P450 messenger ribonucleic acid: evidence for hormonal regulation in rat ovarian follicles and constitutive expression in corpora lutea*. Endocrinology, 1987. **120**(5): p. 1942-1950.
63. Sandhoff, T.W. and M.P. McLean, *Hormonal regulation of steroidogenic acute regulatory (StAR) protein messenger ribonucleic acid expression in the rat ovary*. Endocrine, 1996. **4**(3): p. 259-267.
64. Mellon, S.H. and C. Vaisse, *cAMP regulates P450scc gene expression by a cycloheximide-insensitive mechanism in cultured mouse Leydig MA-10 cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(20): p. 7775-7759.
65. Moore, C.C., S.T. Brentano, and W.L. Miller, *Human P450scc gene transcription is induced by cyclic AMP and repressed by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and A23187 through independent cis elements*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(11): p. 6013-6023.
66. Shaw, N.D., et al., *Estrogen negative feedback on gonadotropin secretion: evidence for a direct pituitary effect in women*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(4): p. 1955-1961.

67. Bogovich, K. and J.S. Richards, *Androgen biosynthesis in developing ovarian follicles: evidence that luteinizing hormone regulates thecal 17 alpha-hydroxylase and C17-20-lyase activities*. *Endocrinology*, 1982. **111**(4): p. 1201-1208.
68. Zhou, G., et al., *Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action*. *J Clin Invest*, 2001. **108**(8): p. 1167-1174.
69. Hawley, S.A., et al., *The antidiabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism*. *Diabetes*, 2002. **51**(8): p. 2420-2425.
70. Long, Y.C. and J.R. Zierath, *AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(7): p. 1776-1783.
71. Khorram, O., et al., *Maternal undernutrition induces premature reproductive senescence in adult female rat offspring*. *Fertil Steril*, 2015. **103**(1): p. 291-298.

Anexos

1)



CIBICA
Comité Institucional de Bioética para la
Investigación con Animales

**ACTA DE EVALUACIÓN BIOÉTICA
007-2013**

I. El Comité Institucional de Bioética para la investigación con Animales de la Universidad de Valparaíso, en su sesión del 1 de Julio de 2013, declara haber evaluado el protocolo experimental del proyecto BEA007-2013 titulado "Maternal obesity previous and during pregnancy in rats and its effect on the reproductive function of the offspring." del investigador responsable Gonzalo Cruz N., adscrito al Departamento de Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso.

II. Para su evaluación el Comité de Bioética revisó los antecedentes presentados en el formulario "SOLICITUD PARA LA APROBACIÓN DE INVESTIGACIÓN QUE INVOLUCRE A ANIMALES COMO SUJETOS DE INVESTIGACIÓN".

III. En la valoración bioética del proyecto, el Comité consideró adecuado los aspectos bioéticos indicados en el segundo punto Valoración de Aspectos Éticos del formulario "SOLICITUD PARA LA APROBACIÓN DE INVESTIGACIÓN QUE INVOLUCRE A ANIMALES COMO SUJETOS DE INVESTIGACIÓN" y que se señalan en las páginas anexas a esta acta.

IV. Por lo anterior, el Comité Institucional de Bioética aprueba el protocolo experimental.

V. Se extiende este certificado para ser presentado al concurso FONDECYT INICIACIÓN EN INVESTIGACIÓN 2013.

Dr. Sebastián San Martín Henríquez
Presidente
Comité Institucional de Bioética para la Investigación con Animales

SEGUNDO: VALORACION DE ASPECTOS ETICOS

(NC: No corresponde)

1. Los animales recolectados vivos serán utilizados sólo para registro de datos (peso, sexo, lugar de muestreo, etc).	SI	NO	NC
En las series experimentales en curso se registrará peso diario, ingesta de alimento y se realizarán frotis vaginales a las hembras. Después del destete a los 21 días de edad, se separarán machos y hembras en jaulas distintas. Después de registrar los datos de las crías de madres controles o alimentadas con HFD, estas crías serán sacrificadas a distintas edades, según se especificó anteriormente en cada objetivo, para la recolección de muestras y tejidos. Las madres serán sacrificadas después del destete.			
2. Los animales obtenidos vivos serán mantenidos en cautiverio y/o en condiciones de laboratorio	SI	NO	NC
X			
<p><i>Explique en qué condiciones serán mantenidos y por cuánto tiempo.</i></p> <p>Los animales serán mantenidos con ciclo luz oscuridad de 12 hrs, prendiéndose la luz de manera automática a las 08:00 am y apagándose de igual manera a las 08:00 pm. La T° de esta sala se mantendrá a 22 ± 1 °C. Durante el período de mantención los animales estarán con disponibilidad <i>ad libitum</i> de agua y comida (HFD o comida control), y serán enjaulados de a 3 ratas por jaula para evitar estrés por hacinamiento. El cambio de viruta a cada jaula, así como el rellenado de agua y comida será realizado a diario de lunes a domingo, tomando la precaución que durante los fines de semanas habrá personal de turno para realizar la mantención de los animales. Se realizará control de peso y ciclicidad estral (mediante frotis vaginales) diariamente.</p> <p>Las ratas preñadas serán colocadas en similares condiciones, pero en jaulas individuales.</p>			
<p><i>Explique qué sucederá con los animales luego de terminado el estudio</i></p> <p>Una vez finalizadas las series experimentales los animales serán sacrificados por decapitación y las muestras recolectadas serán fijadas en Bouin o guardadas a -80°C, según corresponda. El proceso de sacrificio de animales se describió en la sección de metodología.</p>			
3. Su estudio evalúa una práctica clínica (fármacos, aparatos, radiaciones, procedimientos quirúrgicos, otros).	SI	NO	
X			
<p><i>Especifique si su respuesta es SI:</i></p> <p>En esta investigación se realizarán cirugías post mortem a ratas para la extracción de los distintos tejidos. Además se administrará metformina a ratas gestantes.</p>			

4. La práctica clínica considerada en este estudio es invasiva y/o puede potencialmente causar algún grado de malestar, daño físico al animal en estudio, estrés físico, conductual u otro.	SI		NO X	
5. La práctica clínica considerada en este estudio beneficiará directa o indirectamente a los animales del estudio.	SI	NO X	NC	
<i>Especifique si su respuesta es SI.</i>				
6. Señale si los animales obtenidos deben ser sacrificados para la obtención de datos.	SI X		NO	
<i>Justifique el porqué del sacrificio de los animales</i> En este proyecto los animales deben ser sacrificados, debido al interés del investigador responsable en estudiar las distintas hormonas reproductivas en sangre y diversos marcadores moleculares en distintos tejidos.				
<i>Indique el o los métodos eutanasícos que serán utilizados en el estudio</i> En este proyecto se utilizará la decapitación con guillotina. El investigador responsable tiene experiencia en este procedimiento de forma de realizarlo rápidamente y sin infringir estrés o dolor a los animales de experimentación. Esta experiencia proviene de estudios realizados y publicados anteriormente (Cruz et al 2012, Sotomayor et al 2011), sin embargo, planteo realizar un curso de manejo de animales de experimentación que se imparte en la facultad, para obtener la debida certificación). No se administrará soluciones anestésicas ya que estas				
pueden influir en la concentración de neurotransmisores y hormonas que serán medidas en este estudio.				
7. Señale si en este estudio participará una compañía farmacéutica u otra entidad comercial.	SI		NO X	
<i>Especifique si su respuesta es SI. Indique el nombre de la compañía y el grado de participación de la entidad en esta investigación (co-investigadores, colaboradores, apoyo logístico, financiamiento, auspicio u otro).</i>				
8. Tienen los investigadores afiliación o algún compromiso económico o de otra naturaleza con la compañía especificada en el punto 7.	SI		NO X	
<i>Especifique si su respuesta es SI. Indique la naturaleza del compromiso.</i>				

9. ¿Tienen los investigadores afiliación o algún compromiso económico o de otra naturaleza con alguna compañía o institución no especificada en el punto 7 pero que pudiera estar interesada o beneficiarse por el desarrollo de esta investigación?	SI		NO X	
<i>Especifique si su respuesta es SI. Indique la naturaleza del compromiso.</i>				
10. ¿Esperan los investigadores obtener algún beneficio económico u otro directo o indirecto, con el desarrollo de este estudio?	SI		NO X	
<i>Especifique si su respuesta es SI. Indique la naturaleza del beneficio.</i>				
11. Señale su metodología incluye consideraciones a métodos alternativos (3 Rs: reemplazo, reducción y refinamiento)				
<p>La metodología de este proyecto incluye las consideraciones de reducción y refinamiento del método experimental. Por este motivo se pretende usar el número mínimo de animales que permita establecer diferencias estadísticamente significativas (se indicó el cálculo del n mínimo en la sección de metodología). Sin embargo, no es posible reemplazar este modelo animal por algún otro método de simulación <i>in vitro</i>, esto debido a que los efectos producidos por la obesidad materna en la descendencia son efectos multisistémicos que es muy difícil imitar en modelos celulares. Por otra parte, la rata es un excelente modelo para realizar estudios transgeneracionales en la parte reproductiva, ya que tiene ciclos estrales y preñez relativamente cortos con respecto a otros modelos animales. La corta duración de los proyectos de investigación, por otra parte, no permite realizar estudios prospectivos en humanos, que tardarían varios años para obtener resultados consistentes.</p>				
11. ¿Existen algunas otras consideraciones éticas que deban ser evaluadas?				
<p>Todas las consideraciones éticas han sido detalladas en los puntos anteriores de este formulario.</p>				

2) Precisión intra-ensayo ELISA estradiol.

3 muestras fueron analizadas 10 veces con la misma curva de calibrado. Los resultados se expresan en pg/mL.

muestra	media	DE	CV%
1	85,624	7,946	9,3
2	355,735	32,372	9,1
3	1104,385	51,243	4,6

Precisión inter-ensayo ELISA estradiol.

muestra	media	DE	CV%
1	82,044	8,286	10,1
2	324,623	31,813	9,8
3	1153,301	71,505	6,2

Precisión intra-ensayo ELISA testosterona.

3 muestras fueron analizadas 10 veces con la misma curva de calibrado. Los resultados se expresan en ng/mL

muestra	media	DE	CV%
1	0,75	0,07	9,6
2	0,77	0,06	7,7
3	1,37	0,08	6,6

Precisión inter-ensayo ELISA testosterona

3 muestras fueron analizadas 10 veces en un periodo de 4 semanas. Los resultados se expresan en ng/mL

muestra	media	DE	CV%
1	0,76	0,05	9,6
2	3,29	0,28	8,5
3	4,11	0,3	7,3

Precisión intra-ensayo ELISA progesterona

2 muestras fueron analizadas 10 veces con la misma curva de calibrado. Los resultados se expresan en ng/mL

muestra	media	DE	CV%
1	1,89	0,2	10,6
2	14,24	1,45	10,2

Precisión inter-ensayo ELISA progesterona

2 muestras fueron analizadas 10 veces en un periodo de 4 semanas. Los resultados se expresan en ng/mL

muestra	media	DE	CV%
1	2,63	0,33	12,6
2	10,15	1,04	10,2