



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

**“EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE METFORMINA PREVIO Y
DURANTE LA PREÑEZ SOBRE EL CONTROL ADRENÉRGICO
OVÁRICO DE LA DESCENDENCIA DE RATAS CON OBESIDAD
GESTACIONAL INDUCIDA POR LA DIETA”**

Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico

SILVANA SALOMÉ ARAYA RAVANAL

Director de Tesis: Dr. Gonzalo Cruz
Codirector de Tesis: Dra. Daniela Fernandois

Año 2017

Por aguantarme y apoyarme siempre en cada paso, muchas gracias familia querida.

AGRADECIMIENTOS

Estoy muy agradecida de todas las personas que formaron parte de este proceso. Agradezco a mi director de tesis y profesor Gonzalo por los conocimientos y porque tuvo que aguantar mis silencios incómodos, a mi co-directora Daniela por escuchar cada idea que se me ocurría para la discusión, a Jonathan que tuvo la paciencia para enseñar cada técnica del laboratorio y a Tania, que, si de preparar soluciones se trataba, ella siempre estaba dispuesta a ayudar. En general les agradezco por brindarme su apoyo, su paciencia, su tiempo y por sobre todo muchas gracias por el conocimiento entregado.

Agradezco a los integrantes del laboratorio, a Karina por escuchar mis ideas, darme su opinión y ayudarme cada vez que lo necesitaba.

Agradezco a mis amigas y compañeras de carrera Fernanda e Ingrid, que nos apoyamos en cada momento difícil no solo durante la tesis, sino que, durante estos 6 años de carrera, cuando sentíamos que las energías se habían esfumado, siempre había un abrazo, una palabra de ánimo y un toque de alegría.

Un agradecimiento en especial a Patricio que siempre confió en mí, entregándome fuerza y ánimo cuando yo no los tenía.

Con cariño,

Silvana.

FINANCIAMIENTO

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

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

RESUMEN

La obesidad gestacional en nuestro país alcanza cerca del 30% de la población de madres gestantes. Esta condición se asocia a alteraciones metabólicas y reproductivas que afectan a la descendencia en la adultez. Por ejemplo, animales de laboratorio hijas de madres obesas presentan alteraciones en el desarrollo folicular ovárico, pubertad precoz y niveles elevados de estradiol sérico desde el nacimiento hasta la adultez. Ante esto, mejorar perfil metabólico de las madres utilizando metformina podría prevenir el desarrollo de estas alteraciones en las crías cuando adultas. Por otro lado, mujeres con síndrome de ovario poliquístico presentan un aumento de la actividad de sistema nervioso simpático (SNS), contribuyendo a la disfunción ovárica. Nosotros postulamos que las hijas de madres obesas presentan un aumento en la actividad simpática ovárica, efecto que sería prevenido con la administración de metformina a las madres durante la gestación y la lactancia. Para determinar esto, utilizamos la descendencia femenina de ratas Sprague-Dawley alimentadas con dieta control y alta en grasa que fueron tratadas con metformina durante la preñez y la lactancia. En los ovarios de la descendencia se evaluó la actividad del SNS mediante la cuantificación de noradrenalina(NA) y uno de sus metabolitos, el 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG), por HPLC. Además, cuantificamos la expresión de tirosina hidroxilasa, enzima limitante de la síntesis de catecolaminas y del receptor beta₂-adrenérgico. Adicionalmente, se observó la expresión génica del factor de crecimiento nervioso, kisspeptina y la hormona anti-mülleriana(AMH) como marcadores del desarrollo folicular. Nuestros resultados muestran que la descendencia de madres obesas presenta un aumento de la expresión de tirosina hidroxilasa, receptores beta₂-adrenérgicos y de la relación MHPG/NA, indicando un aumento de la actividad del SNS en el ovario, lo que se correlaciona con una posible disminución del desarrollo folicular evidenciado por la disminución de AMH. El tratamiento con metformina disminuye considerablemente los niveles de MHPG en la descendencia, aumenta la expresión de los receptores beta₂-adrenérgicos y aumenta la AMH a los niveles del control. Estos resultados no nos permiten asegurar una disminución o un aumento del tono simpático ovárico de la descendencia de madres con administración de metformina, pero abre un nuevo campo de estudio en los efectos a largo plazo de la administración de metformina durante la gestación.

**EFFECTS OF METFORMIN ADMINISTRATION PRIOR AND DURING PREGNANCY ON
ADRENERGIC CONTROL OF THE OVARY IN OFFSPRING OF RATS WITH DIET INDUCED
OBESITY**

Gestational obesity in our country reaches about 30% of the population of pregnant mothers. This condition is associated with metabolic and reproductive impairments in adult offspring. For example, laboratory animals which are daughters of obese mothers, present alterations in ovarian follicular development, early puberty onset and increased estradiol levels from birth until adulthood. Moreover, improving the metabolic profile of mothers using metformin would prevent the development of these alterations in offspring when adult. On the other hand, women with polycystic ovarian syndrome show an increase in the activity of the sympathetic nervous system (SNS), contributing to ovarian dysfunction. We postulate that the daughters of obese mothers have an increase in ovarian sympathetic activity, an effect that should be prevented by the administration of metformin to mothers during gestation and lactation. To determine this, we used the female offspring of Sprague-Dawley rats fed with control and high fat diets that were treated with metformin during pregnancy and lactation. In the ovaries of offspring, the activity SNS was assessed by quantification of noradrenaline (NA) and one of its metabolites, 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG), by HPLC. In addition, we quantified the expression of tyrosine hydroxylase, the rate limiting step enzyme in the synthesis of catecholamines and the beta₂-adrenergic receptor. In addition, gene expression of nerve growth factor, kisspeptin, and anti-müllerian (AMH) hormone were evaluated as markers of follicular development. Our results show that the offspring of obese mothers have an increase in the expression of tyrosine hydroxylase, beta₂-adrenergic receptors and the MHPG / NA ratio, indicating an increase in SNS activity in the ovary, correlating with a possible decreased follicular development evidenced by decreased AMH. Treatment with metformin in mothers significantly decreases MHPG levels in offspring, increases the expression of beta₂-adrenergic receptors, and increases AMH at control levels. These results do not allow us conclude a decrease or increase in sympathetic ovarian tone of offspring of mothers with metformin administration, but opens a new field of study on the effects of a long-term administration of metformin during gestation.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	8
2. HIPÓTESIS	13
3. OBJETIVOS.....	14
3.1. Objetivo general	14
3.2. Objetivos específicos.....	14
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
4.1. Animales.....	15
4.2. Dieta de los Animales.....	15
4.3. Diseño Experimental	15
4.4. Tratamiento con Metformina (MET).....	16
4.5. Selección de tejidos.....	17
4.6. Extracción de ARN	17
4.7. Extracción y cuantificación de Proteínas	17
4.8. Determinación de los niveles de NA y MHPG por cromatografía de alta resolución acoplado a detección electroquímica (HPLC-EC).....	18
4.9. Determinación de los niveles de tirosina hidroxilasa en el ovario mediante Western Blot.	19
4.10. Determinación de la expresión génica del receptor beta ₂ -adrenérgico, kisspeptina, hormona anti-mülleriana y el factor de crecimiento nervioso en el ovario mediante RT-PCR en tiempo real	20
4.11. Análisis Estadístico.....	21
5. RESULTADOS.....	22
5.1. Niveles de NA y MHPG en ovarios de ratas adultas descendientes de madres tratadas con dieta alta en grasa y metformina.	22
5.2. Niveles de tirosina hidroxilasa en el ovario de las ratas adultas descendiente de madres tratadas con metformina y dieta alta en grasa.	23

5.3.	Expresión del Receptor adrenérgico beta ₂ -adrenérgico en el ovario de las ratas adultas descendientes de madres tratadas con metformina y dieta alta en grasa.....	24
5.4.	Expresión del ARNm del Factor de Crecimiento Nervioso en el ovario de las ratas adultas descendientes de madres tratadas con metformina y dieta alta en grasa.....	25
5.5.	Expresión del ARNm para kisspeptina en el ovario de las ratas adultas descendientes de madres tratadas con metformina y dieta alta en grasa.	26
5.6.	Expresión del ARNm para la Hormona anti-mülleriana en el ovario de las ratas adultas descendientes de madres tratadas con metformina y dieta alta en grasa,.....	27
6.	DISCUSIÓN	28
7.	CONCLUSIONES	37
8.	BIBLIOGRAFÍA	38
9.	ANEXOS	46

1. INTRODUCCIÓN

Obesidad, epidemiología y sus consecuencias

El sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que es perjudicial para la salud¹. La obesidad es producto del desequilibrio entre las calorías consumidas a través de la dieta y las gastadas a través de la actividad metabólica, siendo el consumo de alimentos con un alto contenido calórico y la disminución de la actividad física los factores principales que conducen a esta condición¹. Uno de los indicadores para su diagnóstico es el índice de masa corporal (IMC). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) aquellas personas con un IMC igual o superior a 30 en adultos son consideradas obesas¹. En el año 2014 la OMS informó que alrededor del 13% de la población adulta mundial (un 11% hombres y un 15% mujeres) eran obesos¹. En Chile la obesidad hasta el año 2010 en mayores de 15 años, fue de un 25,1% a nivel nacional, en donde las mujeres representan un 30,7%². Esta predisposición de las mujeres al desarrollo de obesidad ha conducido a que la prevalencia de obesidad gestacional en Chile haya aumentado de un 20,03% en el año 2008 a un 29,93% en el año 2015³.

Las consecuencias que genera la obesidad en el organismo son diversas, dentro de ellas, patologías como la hipertensión arterial, dislipidemias, resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo 2. A nivel reproductivo, la obesidad en la mujer se asocia a anomalías en el ciclo menstrual, una pubertad adelantada, sangrado uterino disfuncional en mujeres posmenopáusicas⁴, infertilidad⁵ y síndrome de ovario poliquístico (SOP)⁶. El SOP es el desorden endocrino más común que afecta a las mujeres en edad reproductiva. Este síndrome se caracteriza por anovulación, hiperandrogenismo, niveles variables de gonadotropinas, amenorrea e infertilidad⁷. Aunque la etiología del SOP sigue siendo desconocida, diversos autores postulan que alteraciones en el microambiente uterino o durante el desarrollo posnatal temprano pueden ser la causa de esta patología⁸⁻⁹. Por otro lado, la obesidad gestacional en la mujer genera diversas complicaciones, dentro de ellas: diabetes gestacional, preeclampsia, tromboembolismo, muerte fetal, complicaciones al nacer¹⁰ y abortos espontáneos¹¹. También puede producir malformaciones congénitas en el gestante, macrosomía fetal y en la edad adulta del hijo aumenta el riesgo de desarrollar obesidad y/o síndrome metabólico¹⁰⁻¹². En este

contexto, la exposición a un ambiente adverso durante la gestación, que es un periodo crítico y vulnerable del desarrollo, puede generar cambios permanentes en la estructura o función del organismo, que perduren hasta la vida adulta. Este concepto es conocido como "programming" o programación fetal¹³. De acuerdo a esta hipótesis, los efectos que la obesidad materna puede producir sobre el individuo en desarrollo son múltiples, y van desde alteraciones en la disponibilidad de macronutrientes, inflamación hasta modificaciones epigenéticas durante el desarrollo¹². Todas estas alteraciones pueden potencialmente conducir al desarrollo de patologías durante la vida adulta, por ejemplo, en humanos existe una relación inversa entre el IMC materno y la edad de la menarquia en las hijas¹⁴. Este hallazgo ha sido replicado en modelos de ratas, en donde se observó que las ratas hijas de madres obesas presentan un adelanto de la pubertad¹⁵. En el estudio de Ambrosetti y cols. (2016) se observó una baja metabolización hepática de estradiol debido a una disminución de la expresión de la enzima CYP3A2, un citocromo mitocondrial encargado de la metabolización de esta y otras hormonas. La disminución de CYP3A2 hepática generó, por lo tanto, un aumento en los niveles séricos de estradiol. Este aumento de estradiol se relacionó directamente con un desarrollo folicular disminuido y la presencia de estructuras quísticas foliculares en el ovario¹⁵. En resumen, los cambios ováricos y hormonales que presentan las ratas hijas de madres obesas emulan algunas características del SOP en humanos¹⁵.

Por otro lado, estudios en humanos han observado una relación directa entre los niveles séricos de hormona anti-mülleriana (AMH) y SOP¹⁶. La AMH es una glicoproteína sintetizada principalmente por las gónadas¹⁷. En el ovario los encargados de su síntesis son las células de la granulosa de los folículos preantrales y antrales pequeños¹⁸⁻¹⁹, siendo un buen marcador de crecimiento folicular. Entre los efectos de la AMH se encuentra el producir una disminución de la sensibilidad folicular a FSH²⁰, además de inhibir el reclutamiento de los folículos preantrales²¹. Considerando que en distintos modelos de ovario poliquístico en roedores se ha encontrado un aumento de los niveles de AMH²², de forma similar a como ocurre en humanos²³, la AMH se considera un potencial marcador de ovario poliquístico²⁴. El SOP suele cursar con hiperandrogenismo el cual afectaría la selección y ovulación folicular provocando una acumulación de folículos de menor tamaño²⁵. Esto hace muy

interesante su estudio en las hijas de madres obesas, ya que, hasta el momento es un campo poco explorado.

Regulación nerviosa ovárica y obesidad

La fisiología reproductiva de los mamíferos requiere tanto de un control neuronal como hormonal. El control hormonal está relacionado con el eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario. La adenohipófisis responde a los niveles GnRH provenientes del hipotálamo liberando las gonadotropinas (FSH y LH), las que favorecen la foliculogénesis y estereodogénesis en el ovario²⁶. En relación al control neuronal, el ovario presenta una inervación simpática y sensorial que se inicia a nivel central en el núcleo paraventricular del hipotálamo y cuyo último relevo nervioso corresponde al ganglio celiaco, lugar desde donde se proyectan las fibras nerviosas que inervan directamente al ovario²⁷. La inervación extrínseca ingresa por dos rutas al ovario: el plexo nervioso ovárico y el nervio ovárico superior (NOS). El NOS está asociado al ligamento suspensorio y conduce al ovario las fibras noradrenérgicas que inervan directamente a los folículos²⁸. Se ha caracterizado que el SNS cumple un rol fundamental en el desarrollo de los folículos ováricos, principalmente a través del neurotransmisor noradrenalina(NA). La NA ejerce su efecto primordialmente sobre los receptores beta₂-adrenérgicos que se encuentran en las células de la granulosa y las células de la teca, regulando también la estereodogénesis²⁹. Respecto a la síntesis de la NA, ésta es regulada por la actividad de la tirosina hidroxilasa(TH), enzima limitante en la biosíntesis de catecolaminas en los nervios simpáticos³⁰. La TH tiene una masa atómica de 240 kDa y está formada por cuatro subunidades de 60kDa, en cada subunidad del tetrámero existen dos dominios, uno catalítico y uno regulador. En relación a su metabolización la NA una vez liberada de las terminaciones sinápticas puede ser metabolizada como recapturada por transportadores de alta afinidad incorporándose a vesículas o metabolizándose por la MAO (monoamino oxidasa) presente en las mitocondrias formando DHPG (3,4-dihidroxifeniletilenglicol), que se transporta desde el terminal sináptico hacia el espacio sináptico pudiendo ser así metabolizado por la COMT(catecol-o-metil transferasa) dando origen a MHPG (3-metoxi-4-hidroxifeniletilenglicol). Otra ruta metabólica para originar el MHPG es la siguiente: la NA liberada de la terminación sináptica es metabolizada por la COMT formando

normetanefrina, esta es reincorporada a la terminación sináptica por transportadores y metabolizada por la MAO a MHPG³¹. Se ha observado que la estimulación eléctrica en el locus coeruleus en ratas presentan un aumento de MHPG y del ratio MHPG/NA en el núcleo paraventricular, relacionándolo como un buen índice de la actividad de las neuronas noradrenérgicas en el cerebro³¹, por esta razón también se ha utilizado para evaluar la actividad noradrenérgica en el ovario en otros modelos experimentales³²⁻³³.

Respecto de la actividad adrenérgica de la NA sobre el desarrollo folicular, estudios realizados por Mayerhofer y cols.(1997) en ratas neonatas demostraron que la incubación de ovarios con isoproterenol, un agonista beta-adrenérgico, aumenta la expresión del receptor de FSH (FSHR), favoreciendo así el desarrollo folicular previo a la acción de la gonadotropinas³⁴. Por otro lado, el desarrollo y la supervivencia de la inervación simpática requiere la acción del factor de crecimiento nervioso (nerve growth factor, NGF), de hecho, existe una relación directa entre el contenido ovárico de NGF y la densidad de las fibras nerviosas²⁶⁻²⁷. Estudios que han bloqueado la acción del NGF en el ovario, utilizando anticuerpos contra esta neurotrofina, muestran un desarrollo folicular alterado, niveles bajos de estradiol y una alteración en la secreción de LH³⁷.

Diversas evidencias han relacionado al SNS y su control neurotrófico mediado por NGF en el desarrollo del SOP. Por ejemplo, ratas con ovario poliquístico inducido por una dosis única de valerato de estradiol durante las primeras 12 horas de vida, presentan un aumento de NGF ovárico, lo que se relaciona con una mayor densidad de fibras nerviosas³⁸. Similar a esto, en mujeres con SOP se ha observado que existe un aumento de la densidad de las fibras nerviosas en el ovario³⁹ y también un aumento de NGF en el líquido folicular⁴⁰. Además, en la revisión realizada por Lansdown (2012) se discute el hecho de que mujeres con ovario poliquístico presentan una hiperactivación adrenérgica generalizada que involucra diversos tejidos, entre lo que se encuentra el ovario⁴¹.

Por otro lado, se ha observado que las ratas senescentes emulan características del SOP humano, por ejemplo: existe un aumento espontáneo de la actividad simpática en el ovario, la que se relaciona con una menor ovulación, disminución del número de folículos pre-ovulatorios, formación de estructuras anómalas (Folículos tipo 3), quistes foliculares⁴² y un aumento de la expresión de

kisspeptina⁴³. De forma interesante, todos estos efectos fueron revertidos al utilizar un bloqueador beta₂-adrenérgico o una simpatectomía ovárica⁴⁴.

Kisspeptina es un péptido que participa directamente en la regulación de la secreción de LH y FSH, dado que participa en la activación y la pulsatilidad de las neuronas hipotalámicas de GnRH⁴⁵. Además, se ha descrito que kisspeptina se expresa en diversos tejidos, incluyendo el ovario⁴⁵, en donde participa de manera local en la ovulación y desarrollo folicular⁴⁶. Más aún, en un estudio postulan que kisspeptina podría antagonizar la acción de la NA sobre la expresión del receptor de FSH en los folículos en desarrollo, produciendo una disminución en el reclutamiento folicular y la sensibilidad de FSH⁴⁶.

Metformina y su relación con SOP

Hoy en día, uno de los principales tratamientos en mujeres con SOP es el uso de euglicemiantes como la metformina. La metformina es un conocido sensibilizador de la insulina⁴⁷. Este fármaco es recomendado como terapia de primera línea en la diabetes mellitus tipo 2 y se ha visto que en mujeres con SOP, que además padecen o no resistencia a la insulina incrementa la ovulación y mejora el ciclo menstrual⁴⁸. Actualmente la metformina no es recomendada por la FDA para su uso en el embarazo puesto que su clasificación es B en teratogenicidad⁴⁹, pero se ha observado que su administración durante el embarazo reduce los abortos y la probabilidad de diabetes gestacional(DG)⁴⁸. En nuestro laboratorio se administró metformina a ratas madres obesas y se observó en la descendencia adulta una disminución de quistes foliculares⁵⁰. Puesto que aún no se tiene conocimiento de los efectos a largo plazo que tendría el uso de este medicamento durante el embarazo, este podría estar influyendo en la disminución de la condición poliquística en la descendencia.

Considerando todos estos antecedentes, en este trabajo se pretende evaluar si la obesidad materna puede programar un aumento del control del SNS en el ovario de la descendencia y si esto se relaciona con marcadores de ovario poliquístico. Además, se pretende observar si la mejora del perfil metabólico de las madres con el uso de metformina previo y durante la preñez, previene el aumento del control simpático en las hijas de madres obesas. Para esto se plantea la siguiente hipótesis.

2. HIPÓTESIS

El tratamiento con metformina previo y durante la preñez previene un aumento del control ejercido por el sistema nervioso simpático sobre el ovario y el aumento de marcadores de ovario poliquístico en ratas descendientes de madres obesas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar si el tratamiento con metformina previo y durante la preñez disminuye el control nervioso simpático sobre el ovario en la descendencia adulta de ratas madres obesas, previniendo la aparición de marcadores de ovario poliquístico.

3.2. Objetivos específicos

- Medir los niveles de tirosina hidroxilasa en el ovario de ratas descendientes de madres con obesidad inducida por una dieta alta en grasa, con y sin tratamiento con metformina previo y durante la preñez por Western Blot.
- Cuantificar los niveles de NA y uno de sus metabolitos el MHPG en el ovario de ratas descendientes de madres con obesidad inducida por una dieta alta en grasa, con y sin tratamiento con metformina previo y durante la preñez mediante HPLC acoplado a detección electroquímica.
- Evaluar la expresión del ARNm de los genes *Ngfb*, *Adrb2*, *Amh* y *Kiss1* en el ovario de ratas descendientes de madres con obesidad inducida por una dieta alta en grasa, con y sin tratamiento con metformina previo y durante la preñez mediante RT-PCR en tiempo real.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Animales

Se utilizó ovarios congelados a -80°C provenientes de una serie experimental del proyecto FONDECYT N° 11130707 cuyo investigador responsable es el profesor Gonzalo Cruz Neculpán. Se utilizó la descendencia femenina de 20 ratas hembras de cepa Sprague Dawley según el diseño experimental que se explicará posteriormente. Las ratas madres que se incluyeron en el estudio pesaban al momento de la selección entre 150-200 g y se alojaron en la sala de mantención de animales del Instituto de Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso durante todo el protocolo. Todos los animales fueron mantenidos en un ambiente con temperatura controlada ($20-22^{\circ}\text{C}$), con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas, agua y comida *ad libitum*.

4.2. Dieta de los Animales

Las ratas madres se alimentaron con una dieta control que contiene un 13,1% de Kcal en grasa (Lab diet 23% proteína, 64% hidratos de carbono, 13% lípidos, equivalentes a 4 Kcal/g) o una dieta alta en grasas que contiene un 60% de Kcal en grasa (High Fat: HF, Research Diet™ USA; 20% proteína, 20% hidratos de carbono y 60% lípidos, equivalentes a 5 Kcal/g). Todas las ratas hembras descendientes fueron alimentadas con la dieta control desde el destete hasta el momento de la eutanasia.

4.3. Diseño Experimental

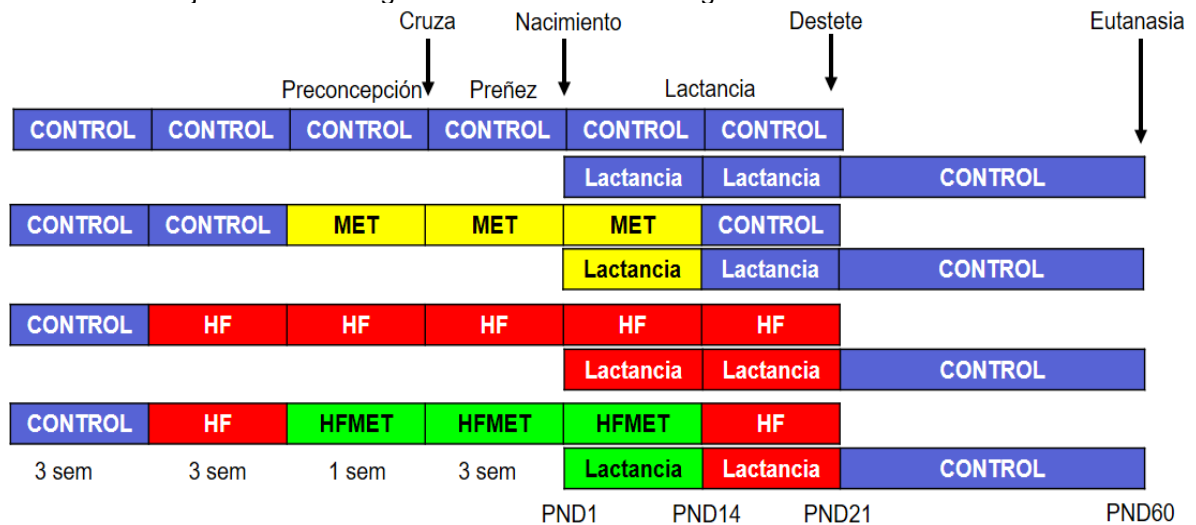
Las 3 primeras semanas todos los animales fueron aclimatados a las condiciones experimentales con dieta control (control diet, CD). Se registró permanentemente el peso corporal, la ingesta alimentaria y la ciclicidad estral a través de frotis vaginal. Desde la tercera semana, las ratas fueron divididas aleatoriamente en dos grupos ($n=10$) según el alimento ingerido consistente en: CD o dieta alta en grasas (high fat, HF). La dieta administrada se mantuvo hasta el periodo de destete que corresponde el día pos-natal (pos-natal day, PND) 21. En el grupo de ratas tratadas con metformina la administración se realizó a las madres hasta el día PND 14 de las crías. Después de 4 semanas de CD o HF las ratas fueron cruzadas con machos reproductores de fertilidad probada alimentados con CD. La confirmación de la preñez se realizó mediante la observación de espermatozoides en el

canal vaginal de la hembra o la observación de ocho diestros consecutivos en el frotis vaginal. Las crías fueron sexadas al PND1 mediante observación genital. Posterior al periodo de destete (PND 21), las crías fueron separadas de sus madres y se mantuvieron con CD. Las crías se sacrificaron mediante decapitación cervical en el primer estro luego del PND 60. Al momento de la eutanasia se recolectó sangre, se midió la glicemia y se recolectaron los ovarios. Los procedimientos de eutanasia de los animales de experimentación fueron realizados por personal capacitado en bioética y manejo de animales de experimentación. 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).

4.4. Tratamiento con Metformina (MET)

Para el grupo de ratas madres tratadas con metformina, una semana antes de iniciar el periodo de cruce se re-agruparon en 4 subgrupos (n=5): CONTROL, MET, HF y HFMET. Se comenzó con el tratamiento, el que se mantuvo hasta el día PND 14 de las crías (cuando las crías empiezan a comer). Se administró una dosis terapéutica en ratas³⁹⁻⁴⁰ de metformina clorhidrato 250 mg/Kg peso/día (metformina 100g, preparado magistral Ecovital), la cual fue disuelta en un vehículo de jalea. Las madres CONTROL y HF también recibieron jalea pero sin el medicamento.

Esquema 1: Representación del modelo experimental. Azul: dieta control. Amarillo: dieta control + metformina. Rojo: dieta alta en grasa. Verde: dieta alta en grasa + metformina.



4.5. Selección de tejidos

Se seleccionó los ovarios provenientes de las hijas de los cuatros grupos experimentales almacenados a -80°C al momento de la eutanasia. A partir de eso se decidió utilizar la mitad del tejido. Cada mitad fue destinado a las diferentes técnicas experimentales a realizar.

4.6. Extracción de ARN

Se pesó la mitad del tejido elegido para ser homogenizado con reactivo TRizol® (Molecular Research Center, Inc; USA). El protocolo consiste en adicionar 1 mL del reactivo por cada 50-100 mg de tejido y debido a que los pesos de los ovarios fueron menor a 25 mg se utilizó la mitad del volumen como también para todos los solventes utilizados. La homogenización vidrio plástico se llevó a cabo bajo campana de extracción. La fase de separación consistió en agregar 200 μL de cloroformo al homogenizado, agitar por 15 s e incubar a T° ambiente por 2-3 min, posteriormente centrifugar a 12.000 g por 15 min a 4°C . Se removió la fase acuosa a un nuevo tubo la cual contiene el ARN y se procedió a la fase de precipitación adicionándose 250 μL de Isopropanol 100% e incubándose 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 μL de etanol 75% se vorteoó 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. La fase de la re-suspensión consistió en adicionar 25 μL de agua libre de ARNasa y para su cuantificación se utilizó el espectrofotómetro de microplaca Epoch (Biotek instrument Inc; USA).

4.7. Extracción y cuantificación de Proteínas

Al igual que el procedimiento anterior se procedió a pesar la mitad del ovario seleccionado antes de realizar la extracción. Este fue homogenizado en vidrio plástico en hielo 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 más el inhibidor de proteasas (Promega®, USA). La cantidad de buffer RIPA fue 10 veces el volumen respecto al peso del tejido. El homogenizado fue centrifugado a 13.000 rpm por 10 min, se recuperó el sobrenadante el cual fue almacenado a -20°C para su posterior cuantificación. Para su cuantificación se utilizó el espectrofotómetro de microplaca Epoch (Biotek instrument Inc; USA).

4.8. Determinación de los niveles de NA y MHPG por cromatografía de alta resolución acoplado a detección electroquímica (HPLC-EC)

Otras mitades de ovarios destinadas a esta técnica también fueron previamente pesadas y luego se les adicionó 200 µl de ácido perclórico 0,2 N para ser homogenizados mediante vidrio plástico y terminando con la utilización de un sonicador (B.Braun, Labsonic 1510) entre 0-400 W por 3 s. Las muestras una vez sonicadas fueron colocadas inmediatamente en hielo. Luego se centrifugaron a 12.000 rpm por 15 min a 4°C. El sobrenadante fue separado y filtrado por un poro de 0,22 µm (13 mm Luer Syringe Filter). 20 µL del filtrado fue inyectado a un sistema de HPLC plus Jasco PU-2089s acoplado a un detector electroquímico EICOM ECD-700S y al digitalizador Jasco LC-NetII / ADC con una columna Kromasil 100-3,5-C18 (AkzoNobel). La fase móvil utilizada fue bombeada a un flujo de 1 mL/min y tuvo la siguiente composición: 0,1 M NaH₂PO₄ x H₂O, 0,14M Octil sulfato, 0,02% EDTA y 1,5 % Acetonitrilo a pH 2,6. Las áreas de los picos de NA y MHPG en las muestras fueron comparadas con estándares de referencia y se calcularon las concentraciones de NA y MHPG usando una curva de calibrado y los cromatogramas fueron integrados con un software JASCO ChromPass Chromatography Data System v1.7.403.1. El potencial del detector amperométrico se fijó en +750 mV para detectar simultáneamente NA y MHPG.

Tabla 1: Para la curva de calibrado se utilizaron los siguientes estándares:

Estándar	Marca	N° de catálogo
(±)-Norepinephrine (+)-bitartrate salt	SIGMA-ALDRICH	A0937
4-Hydroxy-3-methoxyphenylglycol hemipiperazinium salt	SIGMA-ALDRICH	H1377

4.9. Determinación de los niveles de tirosina hidroxilasa en el ovario mediante

Western Blot.

A partir de la extracción de proteínas explicadas anteriormente se realizó la determinación de tirosina hidroxilasa. La separación de las proteínas totales fue realizada mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE), cargando 30 µg de proteínas por pocillo, las cuales al comienzo migraron en un campo eléctrico de 80 V por 15 min seguido de una migración a 100 V durante 2 h y posteriormente fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa a 350 mA por 2 h. Las membranas se lavaron 3 veces por 5 min con TBS-T. El bloqueo de sitios inespecíficos se realizó con leche al 5% en TBS-T por 1 h. Se lavaron las membranas como se mencionó anteriormente. Luego se incubó con el anticuerpo primario anti-tyrosine hydroxylase rabbit para tirosina hidroxilasa durante toda la noche a 4°C. Una vez pasado este periodo las membranas son lavadas 3 veces por 5 min e incubadas con el anticuerpo secundario anti-rabbit IgG conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) durante una hora a temperatura ambiente, finalizado este periodo la membrana es lavada 3 veces nuevamente y se procede al revelado. Para el revelado se utilizó el kit de quimioluminiscencia aumentada EZ-ECL (EZ-ECL®; Biological Industries) y para la detección el equipo EpiChemi3 Darkroom. Las fotos obtenidas fueron procesadas utilizando el software Image-J® (NIH).

Los resultados se normalizaron utilizando la proteína constitutiva GAPDH y se expresan en densidades relativas al control.

Tabla 2: Anticuerpos utilizados y la dilución utilizadas.

Anticuerpos	Fabricante	N° de catalogo	Dilución
Anti-tyrosine hydroxylase Rabbit	SIGMA-ALDRICH	657012	1:1000 en leche 5%
Anti-Rabbit GAPDH	SIGMA-ALDRICH	G9545	1:40000 en TBS-T
Anti-Rabbit IgG	Cell Signaling Technology	7074S	1:10000 en TBS-T

4.10. Determinación de la expresión génica del receptor beta₂-adrenérgico, kisspeptina, hormona anti-mülleriana y el factor de crecimiento nervioso en el ovario mediante 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 acoplada a transcriptasa reversa (RT-PCR) en tiempo real. 1,4 µg de ARN de cada una de la muestra se sometieron a la reacción de transcripción reversa para obtener ADNc. Para llevar a cabo la reacción primero se utilizó un mix que contenía: SuperScript II (Invitrogen™, USA), random primers (Invitrogen™, Usa), inhibidor de RNasa (RNase OUT, Invitrogen™, USA) y dNTP's (Omega Bio-Tek, Inc; Georgia), DTT y Agua libre de RNasa. Posteriormente los ADNc se amplificaron mediante la PCR en tiempo real en presencia de partidores específicos para cada uno de los genes de interés.

Tabla 3: Genes utilizados con los partidores respectivos (Integrated DNA Technologies®, Inc, USA)

Gen	Primer	Secuencia (5' – 3')
<i>Adrb2</i>	Forward	GTT ATC GTC CTG GCC ATC GT
	Reverse	AAG TCC AGA ACT CGC ACC AG
<i>Amh</i>	Forward	GGC TCG CCC TAA CCC TTC AAC C
	Reverse	GTC CCC GCA GAG CAC GAA CC
<i>Kiss1</i>	Forward	CCG GAC CCC AGG AAC TCG
	Reverse	CG TAG CGC AGG CCA AAG GAG
<i>Nfg</i>	Forward	TCA AGA ACG AAA GTC GGA GG
	Reverse	GGA CAT CTA AGG GCA TCA CA
<i>Gapdh</i>	Forward	GAT GCC CCC ATG TTT GTG AT
	Reverse	GGT CAT GAG CCC TTC CAC AAT

Las muestras fueron analizadas por duplicado y el volumen de reacción fue de 10 µL: 2 µL de muestra + 0,5 µL de primer Rw 10 µM + 0,5 µL de primer Fw 10 µM + 5 µL 2X Brilliant Platinum SYBR Green QPCR Master Mix + 2 µL agua libre de RNasa. Después de activada la polimerasa por 10 minutos a 95°C se realizó un protocolo de amplificación de 45 ciclos.

Tabla 4: Condición de reacción de PCR para los distintos genes analizados: se muestra para cada gen la duración y temperatura utilizada en las distintas fases del ciclo de amplificación.

Gen	Desnaturalización	Alineación	Elongación
<i>Adrb2</i>	95°C x 10 s.	62°C x 15 s.	72°C x 20 s.
<i>Amh</i>	95°C x 20 s.	62°C x 20 s.	72°C x 30 s.
<i>Kiss1</i>	95°C x 15 s.	62°C x 20 s.	72°C x 30 s.
<i>Nfya</i>	95°C x 20 s.	60°C x 15 s.	72°C x 20 s.
<i>Gapdh</i>	95°C x 20 s.	60°C x 20 s.	72°C x 30 s.

Para saber la cantidad de producto amplificado el equipo mide la intensidad de la fluorescencia emitida por el SYBR Green el cual se une a las doble hebras formadas de ADN. Para determinar la especificidad del producto formado se realizó una “curva de melting” bajo medición continua de fluorescencia, puesto que cada uno de los productos formados tuvo una temperatura única de desapareamiento (melting point).

Los datos fueron analizados acorde al método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ⁵³ utilizando *Gapdh* como gen constitutivo.

4.11. 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 pos test de Fisher 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.

5. RESULTADOS

5.1. Niveles de NA y MHPG en ovarios de ratas adultas descendientes de madres tratadas con dieta alta en grasa y metformina.

La Figura 1A muestra la concentración de noradrenalina en los distintos grupos experimentales no observándose diferencias entre ellos. En la Figura 1B muestra la concentración del metabolito MHPG en el ovario observándose una disminución en las hijas de madres MET y HFMET. La Figura 1C muestra el contenido de NA en la cual no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos experimentales, en cambio en la Figura 1D que muestra el contenido de MHPG se aprecia una disminución en las ratas hijas de madres MET y HFMET y un aumento en las ratas hijas de madres con dieta HF en comparación con el grupo CONTROL. Por último, se observa una disminución de MHPG en el grupo HFMET en comparación al grupo HF. La Figura 1E muestra la razón de MHPG y NA el cual es un buen índice de la actividad simpática en el ovario, observándose una disminución de la liberación en las ratas hijas de madres MET y HFMET y un aumento en las ratas hijas de madres con dieta HF en comparación al grupo CONTROL.

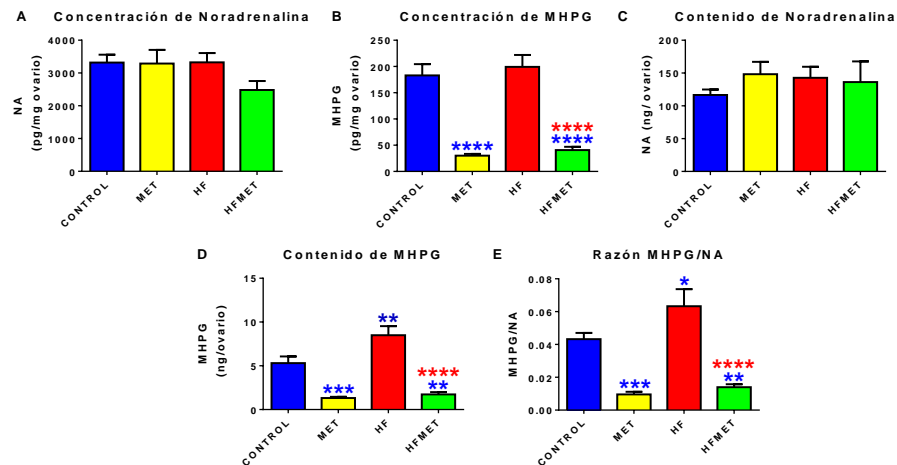


Figura 1: Niveles de NA y MHPG en ovarios de ratas adultas descendientes de madres tratadas con dieta alta en grasa y metformina. A y B. Muestran la concentración de NA y MHPG ajustada por mg de tejido. C y D, muestran el contenido total de NA y MHPG en ovario, respectivamente. Y por último en E es la razón entre MHPG y NA. CONTROL (n=8), MET (n=7), HF (n=6), HFMET (n=6). Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media (EEM). * $p < 0,05$ vs Control. ** $p < 0,001$, *** $p > 0,0001$ **** $p < 0,0001$. El color de los * se relaciona con el grupo comparado.

5.2. Niveles de tirosina hidroxilasa en el ovario de las ratas adultas descendiente de madres tratadas con metformina y dieta alta en grasa.

En la Figura 2 se puede observar que expresión proteica de la enzima tirosina hidroxilasa en el ovario de las ratas hijas de las madres con dieta HF y HFMET presentan un aumento en comparación con el grupo CONTROL.

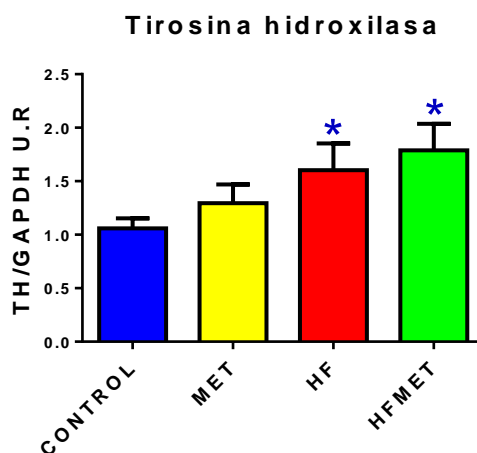


Figura 2: Niveles de tirosina hidroxilasa en el ovario de las ratas adultas descendientes de madres tratadas con metformina y dieta alta en grasa. CONTROL (n=8), MET(n=8), HF (n=7), HFMET (n=5). Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media (EEM). * $p < 0,05$ vs Control. El color de los * se relaciona con el grupo comparado.

5.3. Expresión del Receptor adrenérgico beta₂-adrenérgico en el ovario de las ratas adultas descendientes de madres tratadas con metformina y dieta alta en grasa.

En la figura 3 se puede observar que la expresión del ARNm para el receptor beta₂-adrenérgico en el ovario es mayor en las ratas hijas de madres MET y HF comparado con el grupo CONTROL. Sólo observándose una tendencia en el grupo HFMET respecto del grupo CONTROL.

Expresión del ARNm receptor beta₂-adrenérgico

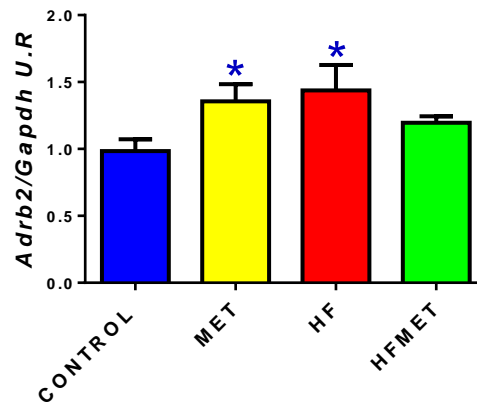


Figura 3: Expresión del receptor beta₂-adrenérgico en el ovario de las ratas adultas descendientes de madres tratadas con metformina y dieta alta en grasa. CONTROL (n=5), MET(n=6), HF (n=5), HFMET (n=5). Los datos se representan como la media ± error estándar de la media (EEM). *P<0,05 vs Control. El color de los * se relaciona con el grupo comparado.

5.4. Expresión del ARNm del factor de crecimiento nervioso en el ovario de las ratas adultas descendientes de madres tratadas con metformina y dieta alta en grasa.

En la figura 4 se puede observar que no existen diferencias estadísticamente significativas en la expresión del ARNm en el ovario para el factor de crecimiento nervioso entre los distintos grupos experimentales.

Expresión ARNm Factor de Crecimiento Nervioso

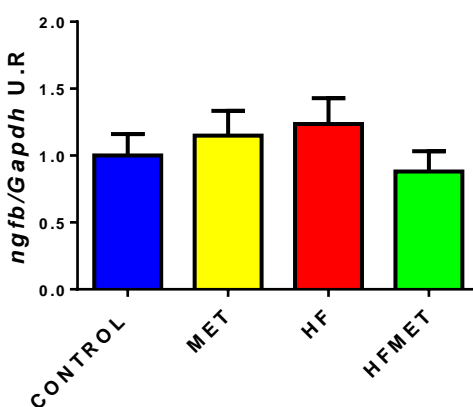


Figura 4: Expresión del ARNm para la proteína NGF en el ovario de las ratas adultas descendientes de madres tratadas con metformina y dieta alta en grasa. CONTROL (n=6), MET(n=6), HF (n=4), HFMET (n4). Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media (EEM). Los datos se distribuyen de forma normal. *p<0,05 vs Control.

5.5. Expresión del ARNm para kisspeptina en el ovario de las ratas adultas descendientes de madres tratadas con metformina y dieta alta en grasa.

En la Figura 5 se puede observar que existe un aumento de la expresión del ARNm para kisspeptina en la descendencia adulta de madres MET y HF en relación con el grupo CONTROL. Para el grupo HFMET se encuentra una tendencia al aumento respecto del control.

Expresión del ARNm para Kisspeptina

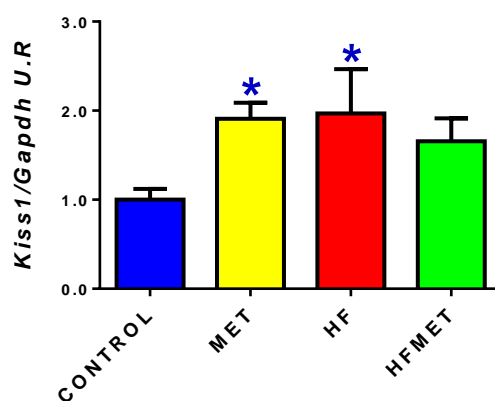


Figura 5: Expresión del ARNm para kisspeptina en el ovario de las ratas adultas descendientes de madres tratadas con metformina y dieta alta en grasa. CONTROL (n=6), MET(n=5), HF (n=5), HFMET (n=4). Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media (EEM). * $p < 0,05$, ** $p < 0.01$. El color de los * se relaciona con el grupo a comparar.

5.6. Expresión del ARNm para la Hormona anti-mülleriana en el ovario de las ratas adultas descendientes de madres tratadas con metformina y dieta alta en grasa,

En la Figura 6 se observa que las hijas de madres HF presenta una expresión disminuida del ARNm para la AMH en comparación al grupo CONTROL. Las hijas de madres HFMET presentan un aumento de su expresión comparado con el grupo HF.

Expresión del ARNm Hormona Anti-Mülleriana

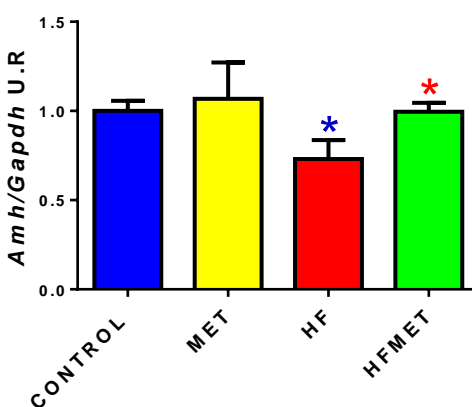


Figura 6: Expresión del ARNm para AMH en el ovario de las ratas adultas descendientes de madres tratadas con metformina y dieta alta en grasa. CONTROL (n=4), MET(n=4), HF (n=4), HFMET (n=4). Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media (EEM). Los datos se distribuyen de forma normal. El color de los * se relaciona con el grupo comparado.

6. DISCUSIÓN

La obesidad materna se ha relacionado a una mayor vulnerabilidad de la descendencia a desarrollar diversas patologías en la adultez. Sin embargo, los mecanismos patogénicos que subyacen a estas alteraciones aun no son completamente conocidos. En el presente estudio observamos que la descendencia femenina de ratas con obesidad gestacional inducida con dieta HF presenta un incremento en el tono simpático del ovario, lo que podría explicar en parte la predisposición de la descendencia a desarrollar la condición de ovario poliquístico. Por otra parte, madres gestantes que consumieron metformina, previo y durante la preñez aparentemente tuvieron una disminución en la actividad del sistema nervioso simpático en el ovario, lo que potencialmente podría prevenir el desarrollo de esta patología en hijas de madres obesas.

Estudios realizados en la descendencia de mujeres con obesidad gestacional han mostrado que existe una relación inversa entre el IMC de la madre previo a la gestación y la edad de la menarquia en las hijas¹⁴. En animales de experimentación se ha observado que la descendencia de madres alimentadas con una dieta alta en grasa presenta una apertura vaginal adelantada, un desarrollo folicular alterado y la presencia de quistes ováricos¹⁵⁻⁵⁴⁻⁵⁵⁻⁵⁶. Estas alteraciones se relacionan a un incremento de los niveles séricos de estradiol endógeno durante el desarrollo posnatal¹⁵. Es interesante notar que en modelos en que se inyecta valerato de estradiol (VE; estradiol exógeno) se producen alteraciones similares, como alteraciones del ciclo estral y la presencia de quistes foliculares⁵⁷⁻⁵⁸⁻⁵⁹. En estos modelos de estrogenización neonatal y prepuberal se ha demostrado un incremento en el tono simpático del ovario y que la denervación quirúrgica del nervio ovárico superior mejoraría la ciclicidad estral y la función ovárica⁵⁹. Esto es concordante con el hecho de que existe una mayor innervación simpática en el ovario de mujeres que presentan SOP³⁹. Más aun, una sobre activación adrenérgica generalizada se relaciona con el riesgo cardiovascular y metabólico de mujeres con SOP⁴¹. En este sentido, se ha observado que terapias avocadas a disminuir el tono simpático como el ejercicio o la acupuntura mejoran el perfil cardiometabólico y reproductivo de las mujeres con SOP⁶⁰.

La descendencia de madres obesas presenta una actividad aumentada del SNS en el ovario

En este trabajo observamos que existe un aumento de la actividad simpática en el ovario de ratas adultas descendientes de madres obesas (Figura 1). El aumento en la actividad simpática es evidenciado en este trabajo por una mayor relación MHPG/NA, ya que, el MHPG es un metabolito que se produce después de la liberación de NA contenida en vesículas. Este aumento en la actividad del SNS puede ser producto de un aumento persistente en los niveles plasmáticos de estradiol durante el desarrollo, particularmente sobre el periodo infantil¹⁵, el periodo más crítico del desarrollo. Esto sería un efecto similar al que se observa en el modelo de inyección de VE⁵⁷.

Como se mencionó anteriormente, las fibras noradrenérgicas que ingresan al ovario se originan y poseen sus somas en el ganglio celiaco (GC)²⁹. El GC es un relevo nervioso que expresa los receptores de estradiol ER α y el ER β , siendo el ER α más abundante⁶¹. Estudios *in vivo* han demostrado que la administración continua de estradiol produce un aumento de la expresión génica de la TH⁶², enzima limitante en la biosíntesis de catecolaminas, y en estudios *in vitro* se observó que este efecto se debe principalmente al actuar sobre el receptor ER α ⁶³⁻⁶⁴. Adicionalmente, se ha observado que la administración de estradiol en ratas ovariectomizadas provoca un aumento de la actividad de TH en el hipotálamo⁶⁵. Considerando esta evidencia, es probable que los niveles elevados de estradiol plasmático que presenta la descendencia de madres obesas (desde el nacimiento hasta la adultez), podrían actuar en el receptor ER α del GC y estar influyendo en un aumento de la síntesis de TH. La TH es una enzima sintetizada en el soma neuronal y transportada hasta las terminaciones sinápticas⁶⁶, en este caso desde el GC hasta el ovario. De hecho, se ha visto que existe un incremento de la velocidad del transporte axonal desde el GC al ovario en ratas a las que se administró VE⁶⁶. Como se puede observar en la figura 2, en este trabajo hemos determinado que los ovarios de las hijas de madres HF poseen un aumento de la expresión de TH, lo que se relaciona con un aumento en la síntesis de catecolaminas en el ovario. Si bien los ovarios de hijas de madres HF no presentaron un aumento significativo de la concentración de NA (Figura1A); el contenido total de NA por ovario (Figura 1C) y el contenido de MHPG (Figura 1D) se encuentran incrementados. En conjunto, el aumento de TH ovárica en las hijas adultas de madres HF respecto

al grupo CONTROL (figura 2) y la razón MHPG/NA (Figura 1E) permiten concluir una actividad simpática elevada en los ovarios de hijas de madres HF, posiblemente debido a la exposición de niveles incrementados de estradiol durante el desarrollo.

Como se muestra en la figura 3 la descendencia adulta de las ratas madres HF presentan un aumento de los niveles del ARNm para el receptor beta₂-adrenérgico. Dado que el receptor beta₂-adrenérgico se expresa tanto en las células de la teca como de la granulosa⁶⁷, el aumento del ARNm del receptor beta₂-adrenérgico evidenciado en este trabajo podría estar relacionado con un aumento del tamaño de los folículos ováricos⁶⁸, o bien con un aumento de los quistes ováricos. Consistentemente, en estudios previos realizados en nuestro laboratorio, la descendencia adulta de madres obesas presenta un aumento ovárico de la expresión génica de este receptor⁶⁹ en conjunto a una hiperinsulinemia y un aumento de quistes foliculares⁵⁰. Esto es importante, debido a que se ha caracterizado que la hiperinsulinemia provoca la hipertrofia de las células de la teca y posterior formación de quistes⁷⁰, puesto que la insulina actuaría de forma similar que la LH⁷¹. Por lo tanto, el aumento de la expresión de los receptores beta₂-adrenérgicos puede ser causado por una hipertrofia de las células de la teca. En resumen, tanto el aumento de la actividad adrenérgica, como el incremento de los receptores b₂-adrenérgico en el ovario pueden alterar el desarrollo folicular normal ovárico y la mantención de los quistes ováricos.

Efectos del aumento del tono adrenérgico en el ovario sobre marcadores de desarrollo folicular en la descendencia de madres obesas.

Una activación crónica de las fibras nerviosas ováricas puede llevar a alteraciones en el desarrollo folicular y formación de estructuras foliculares anómalas como son los quistes. En esta tesis no evaluamos la morfología de los ovarios, sin embargo, evaluamos marcadores de desarrollo folicular que podrían ser afectados por una actividad simpática aumentada.

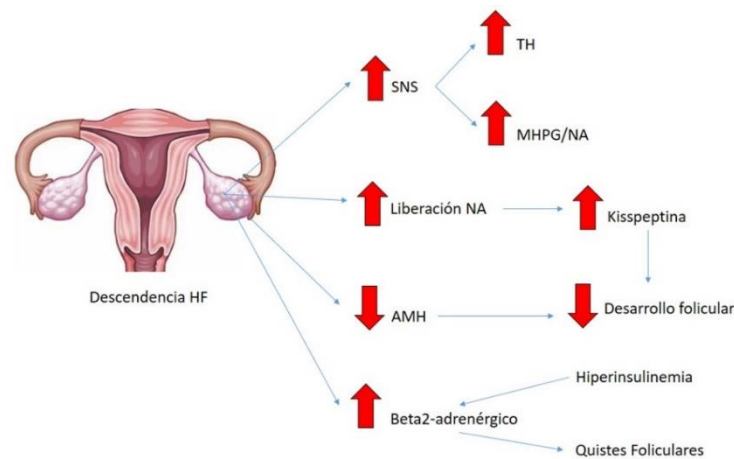
Uno de los marcadores de desarrollo folicular, cuya expresión está bajo el control del sistema nervioso simpático, vía receptores beta₂-adrenérgicos, es kisspeptina. La kisspeptina es un péptido que a nivel del sistema nervioso central participa en la liberación de GnRH del hipotálamo causando un aumento de LH y conduciendo a la ovulación⁴⁵, pero también se ha observado que existe una

expresión local de kisspeptina y su receptor (Kiss1R), tanto en el ovario de la rata como en el de humanos⁷². Fernandois y cols (2016) observaron que existe una correlación positiva entre la liberación de noradrenalina y kisspeptina en ovarios de rata. Además, en otro trabajo se observó que una estimulación beta-adrenérgica ovárica *in vitro* genera un aumento de la expresión de kisspeptina (ARNm y proteína)⁷³. Dado que el promotor de kisspeptina es regulado por el factor transcripcional CREB, NA al inducir la formación de AMPc y activar PKA, podría estar favoreciendo directamente su expresión⁴³, principalmente en las células de la granulosa y la teca, donde encontramos al receptor beta₂-adrenérgico⁶⁷. En conjunto, estas evidencias indican que el aumento de la expresión génica para kisspeptina observado en nuestro estudio (figura 5), estaría mediado por un aumento del tono adrenérgico y de los receptores beta₂-adrenérgicos en los ovarios de ratas descendientes de madres obesas.

Estudios *in vitro* han observado que la kisspeptina por sí sola no genera efectos en el desarrollo folicular, pero en presencia de un agonista beta-adrenérgico como isoproterenol disminuye la expresión del receptor de FSH⁴⁶ (FSHR; receptor clave en el desarrollo folicular). Por el contrario, la administración crónica de un bloqueador beta-adrenérgico provoca una disminución intraovárica de kisspeptina y aumento de la expresión del FSHR⁴³. Esto refuerza la idea de que en la descendencia de madres HF podría existir una disminución en el desarrollo folicular por el efecto antagónico de la kisspeptina sobre la acción de la NA, al disminuir la expresión del receptor de FSH. Explicando así la disminución de los folículos antrales sanos y el aumento de quistes foliculares observados en las hijas de madres obesas¹⁵.

Otro marcador que se relaciona con el desarrollo folicular y el aumento de quistes ováricos es la hormona anti-mülleriana (AMH). La AMH es producida por la gónadas, principalmente por las células de la granulosa de los folículos pre-antrales y antrales pequeños⁷⁴. Se ha visto que dentro de sus acciones se encuentra el inhibir la sensibilidad de la FSH y disminuir la actividad de la enzima aromatasa, encargada de la biosíntesis de estrógenos en las células de la granulosa^{79,80}. Mujeres con SOP presentan niveles elevados de AMH⁷⁶⁻¹⁷, probablemente porque presentan además 12 o más folículos que midan entre 2 mm a 9 mm, los principales productores de AMH¹⁷. En este trabajo

se observa una disminución del ARNm de la AMH en la descendencia de madres obesas con respecto al grupo CONTROL (Figura 6). Esta disminución de la expresión de AMH podría indicar un menor número de folículos pre-antrales y antrales pequeños, sugiriendo nuevamente un menor desarrollo folicular. Por otro lado, en modelos *in vitro* se ha observado que tanto leptina⁴⁵ como estradiol (vía ER β) disminuyen la expresión de AMH⁷⁷. Considerando que estas ratas presentan hiperleptinemia⁶⁹ así como niveles elevados de estradiol durante el desarrollo¹⁵, esto podría contribuir a los niveles disminuido de AMH en las crías de madres obesas.



Esquema 2: Resumen de los efectos observados en la descendencia femenina adulta (PND 60) de madres que cursaron con obesidad durante la gestación.

La administración de metformina a las madres gestantes obesas lleva a una alteración de la actividad simpática en la descendencia

En este estudio observamos que las hijas de madres con administración de metformina durante la preñez y lactancia (MET y HFMET) muestran una aparente disminución de la actividad simpática, efecto evidenciado por una menor razón MHPG/NA en los ovarios de la descendencia (Figura 1E). En este sentido, ya que, el tratamiento con metformina previo y durante la gestación en madres HF evita el aumento de estradiol plasmático en la descendencia⁵⁰ se podría atribuir esta baja actividad simpática a la disminución del efecto trófico de estradiol durante el desarrollo. Es interesante notar que ambos grupos de madres tratadas con metformina, independiente de la dieta, presentan niveles

de MHPG muy por debajo del grupo control (figura 1B y D), pero sólo el grupo HFMET presenta un incremento de la expresión de TH. Esta observación sugiere que la administración de metformina a las madres previo y durante la preñez, independiente de la dieta, provoca una alteración a nivel de liberación o recaptura de catecolaminas, pero no de síntesis. El MHPG es un metabolito de la NA que se genera por la acción secuencial de la COMT y la MAO, luego de la liberación de la NA desde las vesículas hacia el espacio sináptico. Por lo que, la generación del MHPG implica liberación y recaptura de la NA, por lo tanto, una alteración enzimática de la MAO o la COMT, o una alteración de la recaptura vía transportadores de norepinefrina (NET) y dopamina (DAT), podrían potencialmente alterar los niveles del MHPG detectados. Curiosamente, en un análisis aún preliminar de los cromatogramas de nuestras muestras, hemos encontrado que existe una disminución muy significativa de los niveles de un segundo metabolito (de naturaleza aún desconocida) en los ovarios de las crías de madres con administración de metformina previo y durante la preñez (Anexo 1; grupos MET y HFMET), reforzando la idea de una alteración del metabolismo y llevando a una disminución de un metabolito similar. Lamentablemente, dado el alcance de esta tesis, la determinación de otros metabolitos es un trabajo aún en progreso. En conclusión, a pesar de que no se tiene gran conocimiento de los efectos de la metformina administrada durante la gestación y la lactancia sobre la descendencia adulta, de acuerdo a nuestros resultados, podemos evidenciar que la administración de metformina a las madres provoca alteraciones a nivel del control nervioso ovárico, pero el esclarecimiento del mecanismo específico por el cual ocurre esta alteración requiere un estudio más profundo. En resumen, la menor relación MHPG/NA en el grupo HFMET nos lleva a pensar que metformina disminuye la actividad nerviosa simpática en las crías cuando son adultas, sin embargo, la disminución drástica de MHPG tanto en el grupo MET como en HFMET nos indica que podría haber una disminución en la recaptura o metabolismo de la NA, lo que puede llevar a una mayor actividad simpática.

En las Figuras 3 y 4 se puede apreciar que la descendencia de las madres con metformina (MET) presentan un aumento significativo de la expresión génica del receptor beta₂-adrenérgico. Al igual que en el grupo HF este aumento en los receptores podría deberse a una alteración en el número o

tamaño de los folículos que expresan el receptor. Independiente de esto, al parecer las ratas cuyas madres fueron tratadas solo con metformina parecen seguir el perfil de las hijas de madres obesas, teniendo una mayor actividad del sistema nervioso simpático.

Efectos de la alteración del tono adrenérgico en el ovario sobre marcadores del desarrollo folicular en la descendencia de madres tratadas con metformina durante la gestación y lactancia.

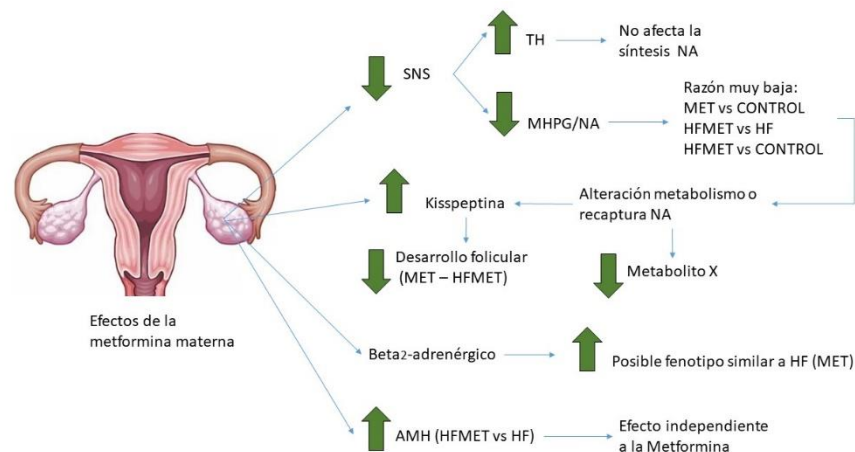
Los niveles elevados de kisspeptina en la descendencia del grupo MET fueron resultados inesperados, y contradictorios. Puesto que según los resultados previamente expuestos la descendencia de las madres MET y HFMET presentarían una actividad simpática muy disminuida. Ante esto, si existiera una menor liberación de NA se esperaría una menor expresión génica de kisspeptina, lo que no es observado, reforzando la hipótesis que la metformina podría estar influyendo en el metabolismo de la NA y por lo tanto aumentando la actividad adrenérgica.

En la misma línea, los niveles elevados de kisspeptina en la descendencia del grupo MET y HFMET, podrían evidenciar un menor desarrollo folicular ante una menor expresión del FSHR, efecto muy similar a lo que ocurre con una administración intraovárica directa de kisspeptina⁴⁶. Esto concordaría con los resultados previos de nuestro laboratorio que muestran que las crías de madres obesas con administración de metformina durante la preñez y lactancia presentan una disminución de quistes foliculares¹⁵. Con respecto a la expresión de AMH, la administración de metformina parece volver a la expresión de esta hormona, sin embargo, el posible mecanismo de esta normalización es una interrogante a resolver en un futuro.

Efecto de la obesidad materna y la administración de metformina sobre la expresión del factor de crecimiento nervioso en el ovario de la descendencia

El factor de crecimiento nervioso es importante para el desarrollo y la sobrevivencia de las fibras nerviosas del ovario. Cabe recordar que en mujeres que presentan SOP existe un aumento de la densidad de las fibras nerviosas que se relaciona con un aumento de NGF³⁹⁻⁴⁰. Como se observa en la figura 4, no se observaron diferencias significativas entre los grupos analizados. En estudios a largo plazo mediante la inducción de ovario poliquístico a través de la administración de VE en los

primeros días de edad, se ha visto un aumento de la actividad simpática en el ovario, presentando un aumento del ARNm de NGF desde horas después de la administración y 30 días posteriores a la exposición, no observando diferencias al día 60 de exposición³⁹⁻⁷⁸. Podría ser, por tanto, que el nivel elevado de estradiol encontrados en la descendencia de madres obesas durante la juventud predispuso un aumento de la densidad de las fibras nerviosas, pero que a los 60 días de vida esto no es evidenciable a través de la expresión de NGF⁶⁵.



Esquema 3: Resumen de los efectos observados en la descendencia femenina adulta (PND 60) de madres tratadas con metformina previo y durante la preñez.

En esta tesis estamos contribuyendo al conocimiento sobre los efectos a largo plazo de la administración de metformina en el embarazo y lactancia. Actualmente, la metformina está clasificada como de bajo riesgo para el uso durante el embarazo debido a no poseer un efecto teratogénico⁴⁹. Sin embargo, no existen estudios a largo plazo que hagan un seguimiento a los hijos nacidos de madres que hayan seguido un tratamiento con metformina durante la gestación. Por otra parte, en esta tesis se hace evidente que la descendencia de madres con obesidad gestacional tiene un mayor tono adrenérgico y probablemente una mayor densidad de fibras nerviosas en el ovario. Otros estudios han demostrado que también existe un mayor tono adrenérgico en el riñón⁷⁸ e hígado^{79,80}, lo que nos lleva a pensar en un efecto multisistémico sobre el sistema nervioso simpático.

En un futuro es importante plantear alternativas farmacológicas que prevengan el desarrollo de estas alteraciones en la descendencia de madres obesas.

7. CONCLUSIONES

- La obesidad materna en ratas produce un aumento de la expresión de tirosina hidroxilasa en el ovario de la descendencia femenina independiente de la administración de metformina, lo que indica un probable aumento de la densidad de fibras nerviosas.
- La obesidad materna produce un aumento de la relación MHPG/NA en el ovario de la descendencia indicando una mayor actividad simpática
- La administración de metformina durante la gestación disminuye considerablemente los niveles del metabolito MHPG en el ovario de la descendencia, por lo que se postula un posible efecto del medicamento en la disminución del metabolismo de la noradrenalina.
- La obesidad materna y la administración de metformina se asocian a un aumento de la expresión de los receptores beta₂-adrenérgicos y kisspeptina, indicando un mayor tono adrenérgico y un menor desarrollo folicular.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. OMS. Obesidad y Sobrepeso. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>. 2016. (página visitada el 30 de Julio del 2017).
2. MINSAL. Indicadores de obesidad en población Chilena. www.sochob.cl/pdf/encuesta_nacional_salud_20092010_obesidad.pdf. 2010.(página visitada el 20 de Julio del 2017).
3. MINSAL. Vigilancia del estado nutricional de la población bajo control y de la lactancia materna en el sistema público de salud de Chile. [http://web.minsal.cl/sites/default/files/files/Informe Vigilancia Nutricional y Lactancia Materna Diciembre 2014.docx.pdf](http://web.minsal.cl/sites/default/files/files/Informe_Vigilancia_Nutricional_y_Lactancia_Materna_Diciembre_2014.docx.pdf). 2015. (página visitada el 28 de Julio del 2017).
4. Must A, Naumova EN, Phillips SM, Blum M, Dawson-Hughes B, Rand WM. Childhood overweight and maturational timing in the development of adult overweight and fatness: the newton girls study and its follow-up. *Pediatrics*. 2005;116(3):620-627.
5. Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Nohr EA, Bonde JP, Sorensen TIA, Olse J. Subfecundity in overweight and obese couples. *Hum Reprod*. 2007;22(6):1634-1637.
6. Vilmann LS, Baker JL, Holm J. Development of obesity and polycystic ovary syndrome in adolescents. *Horm Res Peadiatrics*. 2012;78:269-278.
7. Vaitukaitis J. Polycystic ovary syndrome- what is it? *N Engl J Med*. 1983;309(20):1245-1246.
8. Abbott DH, Dumesic DA, Franks S. Developmental origin of polycystic ovary syndrome – a hypothesis. *J Endocrinol*. 2002;174:1-5.
9. Padmanabhan V, Veiga-lopez A. Developmental origin of reproductive and metabolic dysfunctions: androgenic versus estrogenic reprogramming. *Semin Reprod Med*. 2011;29:173-186.
10. Yu C, Teoh T, Robinson S. Obesity in pregnancy. *An Int J Obstet Gynaecol*. 2006;113:10-15.
11. Lashen H, Fear K, Sturdee DW. Obesity is associated with increased risk of first trimester and recurrent miscarriage : matched case - control study. *Hum Reprod*. 2004;19(7):1644-1646.
12. Elshenawy S, Simmons R. Molecular and cellular endocrinology maternal obesity and prenatal programming. *Mol Cell Endocrinol*. 2016;435:2-6.

13. Lucas A. Original article long-term programming effects of early nutrition: implications for the preterm infant. *J Perinatol.* 2005;25:2-6.
14. Keim SA, Branum AM, Klebanoff MA, Zemel BS. Maternal body mass index and daughters' age at menarche. *Epidemiology.* 2009;20(5):677-681.
15. Ambrosetti V, Guerra M, Ramírez LA, 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;53:258-270.
16. Pigny P, Jonard S, Robert Y, Dewailly D. Serum anti-müllerian hormone as a surrogate for antral follicle count for definition of the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(3):941-945.
17. Lee MM, Donahoe PK. Mullerian inhibiting substance : a gonadal hormone with multiple functions. *Endocrine.* 1993;14(2):152-164.
18. Hirobe S, He WEIWU, Gustafson ML, Maclaughlin DT, Donahoe PK. Mullerian inhibiting substance gene expression in the cycling rat ovary correlates with recruited or graafian follicle selection 1. *Biol Reprod.* 1994;50:1238-1243.
19. Themmen APN, Anton J. Anti-müllerian hormone and anti-müllerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin- induced follicle growth. *Endocrinology.* 1995;136(11):4951-4962.
20. Pellatt L, Rice S, B ND, et al. Anti-Müllerian hormone reduces follicle sensitivity to follicle-stimulating hormone in human granulosa cells. *Fertil Steril.* 2011;96(5):1246-1251.
21. Gruijters M., Visser J., Durlinger A, Themmen A. Anti-Müllerian hormone and its role in ovarian function. *Mol Cell Endocrinol.* 2003;211:85-90.
22. Du D-F, Li X-L, Fang F, Du M-R. Expression of anti-müllerian hormone in letrozole rat model of polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol.* 2014:1-5.
23. Eldar-geva T, Margalioth EJ, Gal M, et al. Serum anti-mullerian hormone levels during controlled ovarian hyperstimulation in women with polycystic ovaries with and without hyperandrogenism. *Hum Reprod.* 2005;20(7):1814-1819.

24. Sopher AB, Grigoriev G, Laura D, et al. Anti-mullerian hormone may be a useful adjunct in the diagnosis of polycystic ovary syndrome in nonobese adolescents. *Pediatr Endocrinol Metab.* 2014;27(11-12):1175-1179.
25. Jonard S, Dewailly D, Flandre AJ De, Euge A, Avine Á. The follicular excess in polycystic ovaries , due to intra- ovarian hyperandrogenism , may be the main culprit for the follicular arrest. *Hum Reprod Update.* 2004;10(2):107-117.
26. Chabbert Buffet N, Djakoure C, Maitre SC, Bouchard P. Regulation of the human menstrual cycle. *Front Neuroendocrinol.* 1998;19:151-186.
27. Gerendai I, Banczerowski P, Halász B. Functional significance of the innervation of the gonads. *Endocrine.* 2005;28(3):309-318.
28. Lawrence IE, Burden HW. The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *Anat Rec.* 1980;196:51-59.
29. Aguadot LI, Ojeda SR. Prepubertal ovarian function is finely regulated by direct adrenergic influences . role of noradrenergic. *Endocrinology.* 1984;114(5).
30. Weiner N. Regulation of norepinephrine biosynthesis. *Annu Rev Pharmacol.* 1970;10:273-290.
31. Lookingland KJ, Ireland LM, Gunnet JW, Manzanares J, Tian Y. 3-Methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol concentrations in discrete hypothalamic nuclei reflect the activity of noradrenergic neurons. *Brain Res.* 1991;559:82-88.
32. Barra R, Cruz G, Meyerhofer A, Paredes A, Lara E. H. Maternal sympathetic stress impairs follicular development and puberty of the offspring. *Soc Reprod Fertil.* 2014;(December):1-32.
33. Bernuci MP, Leite CM, Barros P, et al. Transitory activation of the central and ovarian norepinephrine systems during cold stress-induced polycystic ovary in rats. *J Neuroendocrinol.* 2013;25:23-33.
34. Mayerhofer A, Dissen GA, Costa ME, Ojeda SR. A role for neurotransmitters in early follicular development : induction of functional follicle- stimulating hormone Receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology.* 1997;138(8):3320-3329.
35. Shelton DL, Reichardt LF. Expression of the B-nerve growth factor gene correlates with the

- density of sympathetic innervation in effector organs. *Neurobiology*. 1984;81:7951-7955.
36. Korsching S, Thoenen H. Nerve growth factor in sympathetic ganglia and corresponding target organs of the rat: correlation with density of sympathetic innervation. *Neurobiology*. 1983;80:3513-3516.
 37. Lara HE, McDonald JK, Ojeda SR. Involvement of nerve growth factor in female sexual development. *Endocrinology*. 1990;126(1):364-375.
 38. Sotomayor-Zárate R, Dorfman M, Paredes A, Lara HE. Neonatal exposure to estradiol valerate programs ovarian sympathetic innervation and follicular development in the adult rat. *Biol Reprod*. 2008;78(4):673-680.
 39. Heider U, Pedal I, Spanel-Borowski K. Increase in nerve fibers and loss of mast cells in polycystic and postmenopausal ovaries. *Fertil Steril*. 2001;75(6):1141-1147.
 40. Dissen GA, Garcia-Rudaz C, Paredes A, Mayer C, Mayerhofer A, Ojeda SR. Excessive ovarian production of nerve growth factor facilitates development of cystic ovarian morphology in mice and is a feature of polycystic ovarian syndrome in humans. *Endocrinology*. 2009;150(6):2906-2914.
 41. Lansdown A, Rees DA. The sympathetic nervous system in polycystic ovary syndrome: a novel therapeutic target? *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012;77(6):791-801.
 42. Acuña E, Fornes R, Fernandois D, et al. Increases in norepinephrine release and ovarian cyst formation during ageing in the rat. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009;7:64.
 43. Fernandois D, Cruz G, Na EK, Lara HE. Kisspeptin level in the aging ovary is regulated by the sympathetic nervous system. *J Endocrinol*. 2017;232:97-105.
 44. Fernandois D, Lara HE, Paredes AH. Blocking of β -adrenergic receptors during the subfertile period inhibits spontaneous ovarian cyst formation in rats. *Horm Metab Res*. 2012;44(9):682-687.
 45. Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, et al. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev*. 2012;92:1235-1316.
 46. Fernandois D, Na E, Cuevas F, Cruz G, Lara HE, Paredes AH. Kisspeptin is involved in ovarian follicular development during aging in rats. *J Endocrinol*. 2016;228:161-170.

47. Violett B, Guigas B, Garcia NS, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F. Cellular and molecular mechanisms of metformin : an overview. *Clin Sci*. 2012;122:253-270.
48. Glueck CJ, Wang P. Metformin before and during pregnancy and lactation in polycystic ovary syndrome. *Expert Opin Drug Saf*. 2007;6(2):191-198.
49. Figueroa J, Concha J, Peñaranda C. Guía de Clasificación Teratogénica FDA. <https://www.doctoraugustopereira.com/app/download/5787150225/fda.pdf>.2012.(página visitada el 1 de Agosto del 2017).
50. Álvarez D, Olguín G. Efectos del tratamiento con metformina previo y durante la preñez en ratas madres obesas sobre la función reproductiva de la descendencia femenina. 2015.
51. He L, Wondisford FE. Metformin action: Concentrations matter. *Cell Metab*. 2015;21(2):159-162.
52. Song R. Mechanism of metformin: a tale of two sites. *Diabetes Care*. 2016;39(2):187-189.
53. Salomäki H, Vähätalo LH, Laurila K, 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):1-12.
54. Connor KL, Vickers MH, Beltrand J, Meaney MJ, Sloboda DM. Nature, nurture or nutrition? Impact of maternal nutrition on maternal care, offspring development and reproductive function. *J Physiol*. 2012;5909(5909):2167-2180.
55. Cheong Y, Sadek KH, Bruce KD, MacKlon N, Cagampang FR. Diet-induced maternal obesity alters ovarian morphology and gene expression in the adult mouse offspring. *Fertil Steril*. 2014;102(3):899-907.
56. Lin Y-J, Tsai C-C, Huang L-T, 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):817-826.
57. Barria A, Leyton V, Ojeda SR, Lara HE. Ovarian steroidal response to gonadotropins and is enhanced in polycystic ovary syndrome : role of sympathetic innervation. *Endocrinology*. 1993;133(6):2696-2703.
58. Cruz G, Barra R, González D, Sotomayor-Zárate R, Lara HE. Temporal window in which

- exposure to estradiol permanently modifies ovarian function causing polycystic ovary morphology in rats. *Fertil Steril*. 2012;98(5):1283-1290.
59. Rosa-E-Silva A, Guimaraes MA, Padmanabhan V, Lara HE. Prepubertal administration of estradiol valerate disrupts cyclicity and leads to cystic ovarian morphology during adult life in the rat: Role of sympathetic innervation. *Endocrinology*. 2003;144(10):4289-4297.
 60. Jedel E, Labrie F, Odén A, et al. Impact of electro-acupuncture and physical exercise on hyperandrogenism and oligo / amenorrhea in women with polycystic ovary syndrome: A randomized controlled trial. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011;300:E37-E45.
 61. Anesetti G, Lombide P, Chávez-Genaro R. Prepubertal estrogen exposure modifies neurotrophin receptor expression in celiac neurons and alters ovarian innervation. *Auton Neurosci Basic Clin*. 2009;145(1-2):35-43.
 62. Sabban EL, Maharjan S, Nostramo R, Serova LI. Divergent effects of estradiol on gene expression of catecholamine biosynthetic enzymes. *Physiol Behav*. 2010;99(2):163-168.
 63. Maharjan S, Serova LI, Sabban EL. Membrane-initiated estradiol signaling increases tyrosine hydroxylase promoter activity with ER in PC12 cells. *J Neurochem*. 2010;112(1):42-55.
 64. Maharjan S, Serova L, Sabban EL. Transcriptional regulation of tyrosine hydroxylase by estrogen: opposite effects with estrogen receptors and interactions with cyclic AMP. *J Neurochem*. 2005;93(6):1502-1514.
 65. Beattie W C, Rodgers H C, Soyka F L. Influence of ovariectomy and ovarian steroids on hypothalamic tyrosine hydroxylase activity in the rat. *Endocrinology*. 1972;91:276.
 66. Lara HE, Dissen GA, Leyton V, et al. An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal component of steroid-induced polycystic ovary in the rat. *Endocrinology*. 2000;141(3):1059-1072.
 67. Aguado L., Petrovic S., Ojeda S. Ovarian B-adrenergic receptor during the onset of puberty: characterization, distribution, and coupling to steroidogenic responses. *Endocrinology*. 1982;110(4):1124-1132.
 68. Merz C, Saller S, Kunz L, et al. Expression of the beta-2 adrenergic receptor (ADRB-2) in human and monkey ovarian follicles: a marker of growing follicles? *J Ovarian Res*. 2015;8:8.

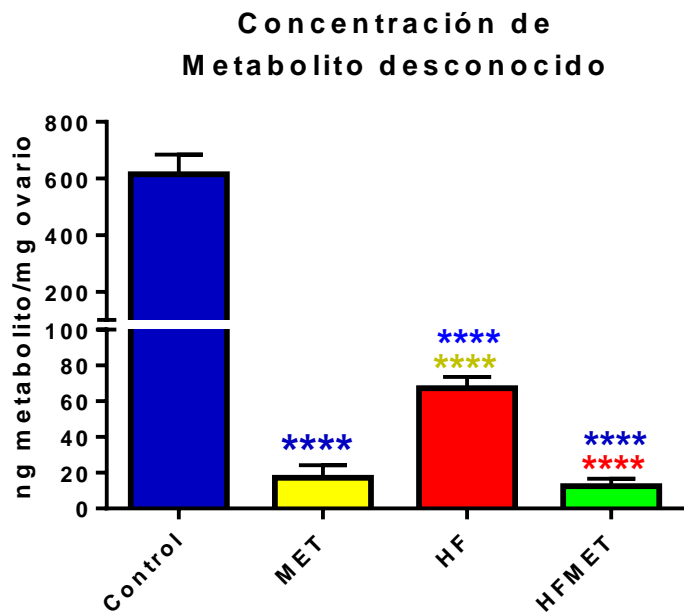
69. Ceballo K. Relación entre los niveles séricos de leptina y el contenido de noradrenalina en el ovario y tejido adiposo en la descendencia de ratas obesas. 2016.
70. Dorfman M, Ramirez VD, Stener-Victorin E, Lara HE. Chronic-intermittent cold stress in rats induces selective ovarian insulin resistance. *Biol Reprod.* 2009;80:264-271.
71. Nestler JE, Jakubowicz DJ, Falcon de Vargas A, Brik C, Quintero N, Medina F. Insulin stimulates testosterone biosynthesis by human theca cells from women with polycystic ovary syndrome by activating its own receptor and using inositolglycan mediators as the signal transduction system. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(6):2001-2005.
72. Gaytán F, Gaytán M, Castellano JM, et al. KiSS-1 in the mammalian ovary: distribution of kisspeptin in human and marmoset and alterations in KiSS-1 mRNA levels in a rat model of ovulatory dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;296(3):E520-E531.
73. Ricu MA, Ramirez VD, Paredes AH, Lara HE. Evidence for a celiac ganglion-ovarian kisspeptin neural network in the rat: Intraovarian anti-kisspeptin delays vaginal opening and alters estrous cyclicity. *Endocrinology.* 2012;153(10):4966-4977.
74. Baarends WM, Uilenbroek JTJ, Kramer P, et al. Anti-müllerian hormone and anti-müllerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin- induced follicle growth. *Endocrinology.* 1995;136(11):4951-4962.
75. Pellatt L, Rice S, Dilaver N, et al. Anti-müllerian hormone reduces follicle sensitivity to follicle-stimulating hormone in human granulosa cells. *Fertil Steril.* 2011;96(5):1246-1251.
76. Durlinger ALL, Kramer P, Karels B a S, et al. Control of primordial follicle recruitment by anti-müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology.* 1999;140(12):5789-5796.
77. Grynberg M, Pierre A, Rey R, et al. Differential regulation of ovarian anti-müllerian hormone (AMH) by estradiol through α - and β -estrogen receptors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(9):1649-1657.
78. Samuelsson AM, Morris A, Igosheva N, et al. Evidence for sympathetic origins of hypertension in juvenile offspring of obese rats. *Hypertension.* 2010;55(1):76-82.
79. Oben JA, Mouralidarane A, Samuelsson A-M, et al. Maternal obesity during pregnancy and lactation programs the development of offspring non-alcoholic fatty liver disease in mice. *J*

Hepatol. 2010;52(6):913-920.

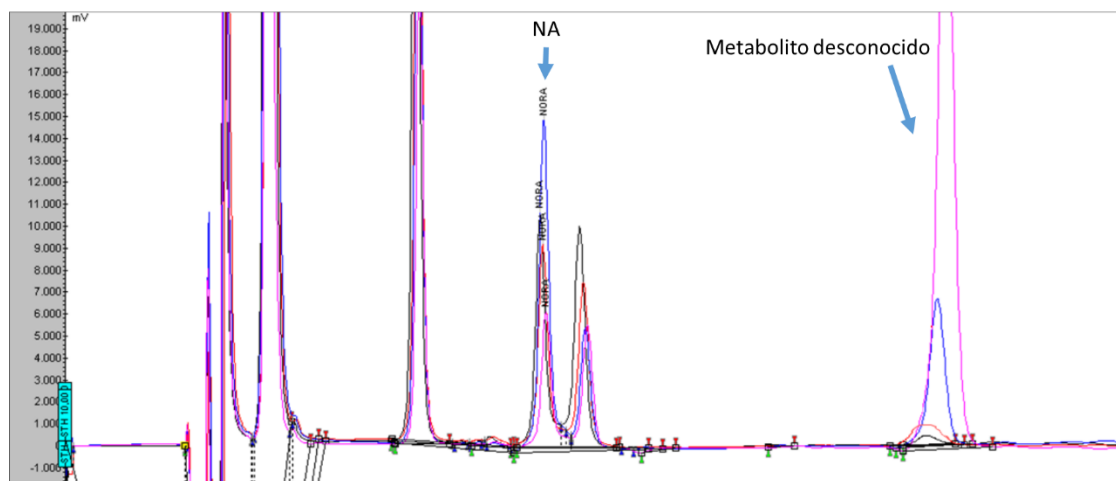
80. Cortez J, Rojas C. Influencia del sistema adrenérgico en el desarrollo de la enfermedad de hígado graso no alcohólico en la descendencia de ratas con obesidad gestacional. 2016.

9. ANEXOS

A)



B)



ANEXO 1: Niveles de Dopamina en ovarios de ratas adultas descendientes de madres tratadas con dieta alta en grasa y metformina. A) CONTROL (n=8), MET (n=7), HF (n=6), HFMET (n=6). B) Cromatograma representativo. Flechas indica Noradrenalina y el metabolito desconocido respectivamente. Línea rosada=CONTROL, línea azul=HF, línea roja MET y línea negra HFMET. Los datos se representan como la media \pm EEM. **** $p < 0,0001$. El color de los * se relaciona con el grupo comparado.

ANEXO 2: Acta de aprobación del comité de bioética

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.		X	
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> 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 periodo 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. 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> 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> 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. <i>Especifique si su respuesta es SI.</i>	SI	NO X	NC	
6. Señale si los animales obtenidos deben ser sacrificados para la obtención de datos. <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 eutanásicos 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.	SI X		NO	
7. Señale si en este estudio participará una compañía farmacéutica u otra entidad comercial. <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>	SI		NO X	
8. Tienen los investigadores afiliación o algún compromiso económico o de otra naturaleza con la compañía especificada en el punto 7. <i>Especifique si su respuesta es SI. Indique la naturaleza del compromiso.</i>	SI		NO X	

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)				
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.				
11. ¿Existen algunas otras consideraciones éticas que deban ser evaluadas?				
Todas las consideraciones éticas han sido detalladas en los puntos anteriores de este formulario.				

