



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 EN LA TERMOGÉNESIS A
TRAVÉS DEL CONTROL ADRENÉRGICO EN LA
DESCENDENCIA FEMENINA ADULTA**

Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico

Fernanda Beatriz Álvarez Toledo

Director de Tesis: **Dr. Gonzalo Cruz Neculpán**
Co-director de Tesis: **Dr. Jonathan Martínez Pinto**

2017

*“Por tus alentadores maullidos durante mi estadía
en la habitación del tiempo”
A bebé.*

Agradecimientos

Dedico este trabajo a mi familia. A mi padre *Ramón* por enseñarme el valor del conocimiento como una armadura de poder y brindarme la mejor educación posible. A mi madre *Beatriz* y tío *Peter* por su apoyo y comprensión dentro de este largo periodo académico y confiar en mis capacidades. A mi hermana *Francisca*, alias “*Waras*”, por ser mi compañera incondicional en todo momento, por tu confianza, apoyo y protección en estos 25 años, sinceramente no sé qué haría sin ti.

A mi pololo *Camilo*, porque apareciste en este difícil periodo a brindarme tu apoyo y cariño sin más que un besito de puntitas a cambio. Gracias por tu paciencia y amor (*mención honrosa por ayudarme a corregir la bibliografía*).

A mis amigas, *Silvana* e *Ingrid*, ¿quién más que Uds. pueden comprender mejor el sentimiento dentro de estos 5 años? Gracias por darme su compañía, amistad y todos los momentos geniales que atesoro en mi corazón. Además, gracias por sus consejos de “mujeres científicas”, por entenderme en mi enorme caos interior y por, sobre todo, soportar mi hiperventilada personalidad. Gracias chicas por todos estos años de diversas emociones; como siempre dije “tres cabezas piensan mejor que una” y juntas lo hacemos mejor.

Agradezco, en forma muy especial, a mi director de tesis *Gonzalo Cruz*, por acogerme en su laboratorio, por su enseñanza y por todo el conocimiento que me ha brindado, sinceramente Ud. crea profesionales con vocación y amor por su trabajo. Además, muchas gracias por aceptar cada personalidad dentro de su laboratorio y por creer en las mujeres como gran aporte para la ciencia. También a mi co-director, *Jonathan Martínez*, por enseñarme y acompañarme en los secretos detrás de cada análisis, por ser lo más parecido a un científico sacado de los libros de ciencia ficción y por su inmensa (suprema) paciencia conmigo. Gracias a ambos por su apoyo y confiar en mí.

A *Tania Cerda* y *Kari*, agradezco enormemente su dedicación, voluntad y gran ayuda, ya que sin su trabajo esto no hubiese sido posible.

A mi comisión, la Dra. *Daniela Fernandois*, por su voluntad, amabilidad, enseñanza y por ser un gran ejemplo como científica, sinceramente admiro su conocimiento y humildad. Gracias por sus críticas y mejoras constructivas para esta tesis.

Finalmente, agradezco a cada profesor que me brindó una oportunidad para ayudarlo en sus quehaceres como docentes y poder regalar un poco de conocimiento a mis futuros colegas (primero a *Marcela Goddard*, *Leticia Luna*, *Caroline Weinstein* y *Gabriela Lobos*). ¡¡Muchas gracias a todos mis compañeros y futuros colegas por estar juntos en este camino!!

***Con cariño,
Fernanda.***

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 materna predispone al desarrollo de diversas alteraciones metabólicas en la progenie, incluyendo una disfunción del tejido adiposo pardo (BAT). El BAT participa en el balance energético mediante su capacidad termogénica a través de la proteína desacoplante 1 (UCP1). Esta función es regulada por el sistema nervioso simpático (SNS). La descendencia de madres obesas presenta alteraciones en la función del SNS que podrían ser revertida con la administración de metformina durante la gestación. El objetivo de esta tesis fue evaluar la función y el control simpático del BAT en ratas descendientes de madres obesas y además tratadas con metformina durante la gestación y lactancia.

Ratas Sprague Dawley fueron alimentadas con dietas control (CD) o alta en grasa (HF) durante la gestación y lactancia. Una semana antes del apareamiento la mitad de las ratas recibieron metformina (250 mg/kg), para luego analizar los niveles de noradrenalina (NA), la expresión génica de β -adrenoreceptores (β -ARs) y los factores termogénicos *Ppar γ* , *Prdm16*, *Pgc1 α* y *Ucp1* en el BAT de la descendencia femenina adulta.

El contenido de NA en el BAT aumentó en crías de madres obesas sin y con metformina. Se encontró que la metformina aumenta la expresión génica de β 1AR en el grupo HF, mientras que en ratas controles aumenta la expresión génica de β 3AR. *Ppar γ* , *Prdm16* y *Pgc1 α* presentan un aumento de expresión en CD+met, mientras que los mismos genes presentan disminución en el grupo HF+met. Además, *Pgc1 α* aumenta su expresión en HF. En cuanto a proteína, se encontró aumento de UCP1 solo en el grupo HF respecto a CD. En conclusión, la exposición a una dieta HF durante la preñez y lactancia afecta la actividad adrenérgica y la expresión génica de factores termogénicos en las crías, lo cual no puede revertirse con el tratamiento de metformina durante la preñez y lactancia.

EVALUATION OF TREATMENT PREVIOUS AND DURING PREGNANCY WITH METFORMIN ON OBESE MOTHER RATS AND ITS EFFECTS IN THERMOGENESIS THROUGH ADRENERGIC CONTROL IN ADULT FEMALE OFFSPRING

Maternal obesity predisposes to various metabolic abnormalities in the progeny, including brown adipose tissue (BAT) dysfunction. BAT participates in the energy balance performing thermogenesis through the uncoupling protein 1 (UCP1). This function is regulated by the sympathetic nervous system (SNS). The offspring of obese mothers presents alterations in the SNS function that could be prevented with the administration of metformin during gestation. The aim of this thesis was to evaluate the function and the sympathetic control of BAT in offspring rats of obese mothers which receive metformin during gestation and lactation.

Sprague Dawley rats were fed with control diet (CD) or high fat diet (HF) during gestation and lactation. One week prior to mating, half of the rats received metformin (250 mg / kg), then the levels of noradrenaline (NA), gene expression of β -adrenoreceptors (β -ARs) and thermogenic factors *Ppar γ* , *Prdm16*, *Pgc1 α* and *Ucp1* were evaluated in BAT of adult female offspring

NA content in BAT increased in offspring of obese mothers and metformin treated rats. Metformin increased the gene expression of $\beta1AR$ in the HF group, whereas it increases the gene expression of $\beta3AR$ in control rats. The expression of *Ppar γ* , *Prdm16* and *Pgc1 α* factors increased in CD + met, while the same genes presented a decrease in the HF + met group. Additionally, *Pgc1 α* increased its expression in HF. UCP1 protein was increased only in the HF group compared with CD. In conclusion, exposure to HF diet during pregnancy and lactation affects the adrenergic activity and gene expression of thermogenic factors in the offspring, which cannot be reversed with metformin treatment during pregnancy and lactation.

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN	8
1.1 Epidemiología de la obesidad.....	8
1.1.2 Obesidad gestacional y sus efectos transgeneracionales	8
1.2 Órgano Adiposo: Estructura y fisiología.....	10
1.2.1 Plasticidad del Órgano Adiposo.....	12
1.3 Participación del Sistema nervioso simpático en la termogénesis.....	13
1.4 Metformina como posible tratamiento para prevenir el aumento de la prevalencia de la obesidad.....	14
2 HIPÓTESIS	16
3 OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo General.....	17
3.2 Objetivos Específicos	17
4 MATERIALES Y MÉTODOS	18
4.1 Muestras utilizadas.....	18
4.2 Animales y dieta	18
4.3 Diseño Experimental.....	18
4.4 Tratamiento con metformina.....	19
4.5 Mediciones analíticas	21
4.5.1 Extracción de proteínas totales a partir de homogenizado de tejido adiposo.	21
4.5.2 Cuantificación de proteínas	21
4.5.3 Determinación de los niveles relativos de UCP1 por Western blot.	21
4.5.4 Determinación de noradrenalina por ELISA.....	22
4.5.5 Determinación de la expresión de ARNm para los genes de interés en tejido graso por PCR en tiempo real.	22
- Extracción de ARN:	22
- Síntesis de ADNc:	23
4.6 Análisis estadístico	25
5 RESULTADOS	26
5.1 Objetivo 1	26
5.1.1 Concentración de noradrenalina en el tejido adiposo	26

5.2 Objetivo 2	28
5.2.1 Expresión transcripcional de β ARs en tejido de adiposo pardo	28
5.3 Objetivo 3	30
5.3.1 Expresión de Ppar γ , Prdm16 y Pgc1 α en el tejido de adiposo pardo	30
5.4 Objetivo 4	32
5.4.1 Expresión de Ucp1 en el tejido de adiposo pardo.....	32
6 DISCUSIÓN.....	34
7 CONCLUSIÓN	42
8 BIBLIOGRAFÍA.....	44
9 ANEXOS	53
9.1 Composición de la dieta control y la dieta alta en grasas de las ratas.....	53
-Dieta Control (CD).....	53
-Dieta alta en grasas (HF)	54
9.2 Peso corporal de la descendencia femenina día post-natal (PND) 1 al 60.....	55
9.3 Peso del tejido adiposo blanco retroperitoneal (RpAT).....	56
9.4 Acta de aprobación del comité de bioética	57

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

AMPK: Proteína kinasa activada por AMP

ATP: Adenosín trifosfato

BAT: Tejido adiposo pardo

CD: dieta control

CNPC: Centro de Neurobiología y Plasticidad Cerebral

CONICYT: Comisión Nacional de Investigación, Ciencia y Tecnología

DHPG: 3,4-dihidroxifenilglicol

DMG: Diabetes mellitus gestacional

ELISA: Ensayo por inmuno absorción ligado a una enzima

ENS: Encuesta nacional de salud

FDA: Food and Drug Administration

GPG: Ganancia de peso gestacional

HF: Dieta alta en grasas

iBAT: Tejido adiposo pardo interescapular

LARM: Laboratorio de Alteraciones Reproductivas y Metabólicas

LKB1: Kinasa hepática B1

Met: Metformina

MHPG: 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol

NA: Noradrenalina

OMS: Organización mundial de la salud

OXPHOS: Fosforilación oxidativa

PGC-1 α : Co-activador de PPAR

PND: Día post-natal

PPAR γ : Receptor activado por proliferadores de peroxisomas γ

PRDM16: Proteína 16 que contiene el dominio homólogo PRD1-BF1-RIZ1

RpAT: Tejido adiposo retroperitoneal

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa a acoplada a transcriptasa reversa

SNS: Sistema nervioso simpático

UCP1: Proteína desacoplante 1

VMA: Ácido vanililmandélico

WAT: Tejido adiposo blanco

β ARs: Receptores adrenérgicos β

$\Delta\mu_{H^+}$: Gradiente de protones

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología de la obesidad

La obesidad es un importante problema de salud pública a nivel mundial, no solo por los altos costes sociales y económicos que involucra, sino también, por su estrecha relación con enfermedades crónicas no transmisibles, por ejemplo, coronarias, hipertensión arterial, diabetes mellitus tipo 2 y dislipidemias, entre otras, contribuyendo también al desarrollo de algunos tipos de cáncer [1, 2] .

La Organización Mundial de la Salud (OMS) describe a la obesidad y el sobrepeso como una acumulación excesiva de grasa, la cual puede resultar perjudicial para la salud [3]. Desde 1980 a la fecha, la prevalencia de obesidad y enfermedades metabólicas relacionadas han ido en aumento, encontrándose que alrededor del 52% de la población mundial adulta presenta algún grado de exceso de peso, de los cuales el 39% corresponde a sobrepeso y un 13% a obesidad [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 una 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].

1.1.2 Obesidad gestacional y sus efectos transgeneracionales

La obesidad pregestacional y el exceso de ganancia de peso gestacional (GPG) incrementan la probabilidad de manifestar complicaciones maternas, como lo son la diabetes mellitus gestacional (DMG), trastornos hipertensivos, eclampsia y complicaciones durante el trabajo de parto [7, 8], tales

como, prolongación del tiempo de éste, laceraciones perineales, atonía uterina, hemorragia anormal y cesárea [9, 10]. Asimismo, se puede presentar alteraciones en la lactancia, retención de peso posparto y subsecuente desarrollo de obesidad [11].

Sin embargo, el neonato igualmente puede presentar repercusiones de esta enfermedad, de las cuales las principales son: excesivo crecimiento fetal, mayor peso al nacer, malformaciones congénitas, prematuridad, riesgo de padecer hipoglicemia y mayor prevalencia de mortalidad [12-15]. Además de las complicaciones perinatales asociadas a la obesidad, existe fuerte evidencia que vinculan al exceso de GPG y la DMG con el desarrollo a largo plazo de enfermedades crónicas no transmisibles en la descendencia, como diabetes mellitus tipo II, enfermedades cardiovasculares, dislipidemias, entre otras [16-18]. Si bien, estilos de vida poco saludables contribuyen al desarrollo de la obesidad, se ha evidenciado que un ambiente obesogénico gestacional y perinatal puede favorecer el padecimiento de esta enfermedad y sus comorbilidades [19, 20]. Este fenómeno puede ser explicado a través del concepto “*programming*” o programación, el cual se refiere al efecto de un estímulo en un período crítico o sensible del desarrollo, que resulta en un cambio permanente o de largo plazo en la estructura o función del organismo [21].

Estudiar este hecho, se hace aún más necesario, considerando las evidencias, tanto en humanos como en modelos murinos, que relacionan la influencia del ambiente tanto *in utero* como postnatal respecto al peso corporal y la homeostasis energética de la edad adulta. Más aún, estudios en animales demuestran claramente que la obesidad y el consumo de dietas ricas en grasas saturadas durante el embarazo o la lactancia aumentan el riesgo de obesidad y síndrome metabólico en la descendencia, independiente de su futura dieta [22].

1.2 Órgano Adiposo: Estructura y fisiología.

El órgano adiposo se compone de varios depósitos grasos, que en los pequeños mamíferos están representados principalmente por los depósitos dérmicos, subcutáneos (superior e inferior), mediastínico, mesentérico, perigonadal, perirrenal y retroperitoneal [23]. Éste tiene un rol esencial en la homeostasis energética de todo el organismo a través de su función metabólica, endocrina y termogénica [24].

El órgano adiposo se compone por dos tejidos: el tejido adiposo blanco (WAT: White adipose tissue) y el tejido adiposo pardo (BAT: Brown adipose tissue), los cuales están compuestos de adipocitos y células del estroma del tejido conectivo, no obstante, ambos poseen distintas características morfológicas y funcionales [25].

El WAT está formado por adipocitos blancos, los cuales contienen una gran gota lipídica unilocular (20-200 μm) la que comprime el núcleo hacia la membrana plasmática resultando en la casi desaparición del citoplasma y una escasa cantidad de mitocondrias [26]. Su principal función es el almacenamiento de ácidos grasos, conservando el exceso de calorías para su uso en situaciones de escasez energética [27]. Esta función está controlada por la leptina, la cual es una hormona que es secretada por este mismo tejido y ejerce su acción sobre centros hipotalámicos y otros objetivos periféricos [28, 29].

Por otro lado, el BAT contiene adipocitos pardos multiloculares con abundantes mitocondrias [30], las cuales tienen una alta capacidad oxidativa y expresan la proteína desacoplante 1 (UCP1) en su membrana interna. La UCP1 desacopla la cadena respiratoria de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) para producir calor [31].

Durante la respiración mitocondrial, se genera un gradiente de protones ($\Delta\mu_{H^+}$) en la membrana interna mitocondrial a partir de un flujo de electrones que se transfieren de un complejo a otro de la cadena transportadora de electrones debido a la oxidación de sustratos. La energía proveniente de este $\Delta\mu_{H^+}$ está generalmente acoplada a la síntesis de ATP. Sin embargo, como se muestra en la figura 1, UCP1 disminuye el $\Delta\mu_{H^+}$ disipando la energía en forma de calor, proceso conocido como termogénesis [26]. En murinos, la termogénesis permite el control de la temperatura corporal y el control del peso mediante el gasto energético. Sin embargo, en los últimos años algunos autores han demostrado que los humanos adultos también presentan un BAT funcional [32, 33], con incidencia y actividad inversamente correlacionadas con la temperatura, la edad y el contenido de grasa corporal [34], lo que indica un posible papel de este tejido en la homeostasis energética del ser humano adulto [33, 35].

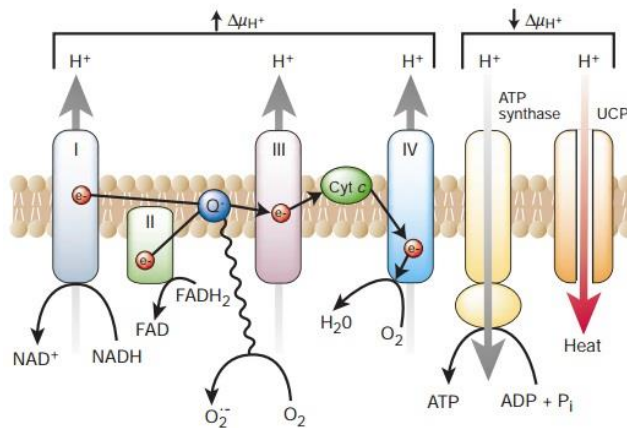


Figura 1. Esquema del desacoplamiento la síntesis de ATP durante la fosforilación oxidativa. En la cadena transportadora de electrones mitocondrial los complejos I y II reciben los electrones del NADH o FADH₂. Estos electrones se transfieren de ambos complejos a la Coenzima Q que los cede al complejo III. Desde éste, los electrones son cedidos al citocromo c y al complejo IV, que a su vez cataliza la reducción del oxígeno molecular a agua y genera un gradiente de protones en la membrana interna. Las UCPs constituyen una vía alternativa de reentrada de protones en la matriz, permitiendo el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. Imagen extraída de Brownlee (2001)[36].

1.2.1 Plasticidad del Órgano Adiposo

El tejido adiposo es un órgano extremadamente plástico capaz de expandirse, reducirse o transformarse bajo ciertos estímulos, dentro de los más comunes se encuentran: estimulación del receptor β -adrenérgico 3 (β_3 AR), aclimatación a diferentes temperaturas, embarazo/lactancia, obesidad, ayuno y restricción calórica [37]. Últimamente, se ha descubierto que ciertos depósitos de WAT, mayoritariamente el subcutáneo inguinal [38], podrían adquirir un fenotipo BAT bajo estos mismos estímulos. A estos adipocitos pardos inducibles o reclutables se les conoce como brite (Brown in White) o beige [37], y poseen baja actividad termogénica y un pequeño número de mitocondrias en estado basal [39]. No obstante, bajo los estímulos anteriormente mencionados pueden ser activados y expresar UCP1 y otros genes relacionados con la termogénesis.

Actualmente se reconocen dos tipos distintos de adipocitos pardos, los cuales derivan de linajes celulares distintos. Por un lado, el BAT surge de un linaje celular Myf5+, similar al músculo, mientras que los adipocitos beige, que emergen en depósitos de WAT bajo estímulos positivos, no provienen de un linaje Myf5+ [40]; sin embargo, ambos expresan UCP1, esencial para la termogénesis. Esta capacidad termogénica está determinada por el número de adipocitos (proliferación versus apoptosis), diferenciación del tejido, densidad de mitocondrias y cantidad de UCP1. Para esta labor, es necesaria la expresión de ciertos factores transcripcionales (figura 2), en donde el receptor activado por proliferadores de peroxisomas γ ($PPAR\gamma$) es un importante mediador de la proliferación y diferenciación de los adipocitos pardos [41], el cual requiere de la acción conjunta de la proteína 16 que contiene el dominio homólogo PRD1-BF1-RIZ1 (PRDM16) para el desarrollo de adipocitos que expresen UCP1. Estudios en ratones “*knockdown*” para el gen *Prdm16* han mostrado una mayor producción de WAT y células miogénicas en estos ratones, con un descenso significativo del BAT [42].

Otro factor importante en el desarrollo de la capacidad termogénica en estas células es el co-activador de PPAR (PGC-1 α) que controla la biogénesis y respiración mitocondrial e induce la expresión de UCP1, resultando en un aumento de la termogénesis [43].

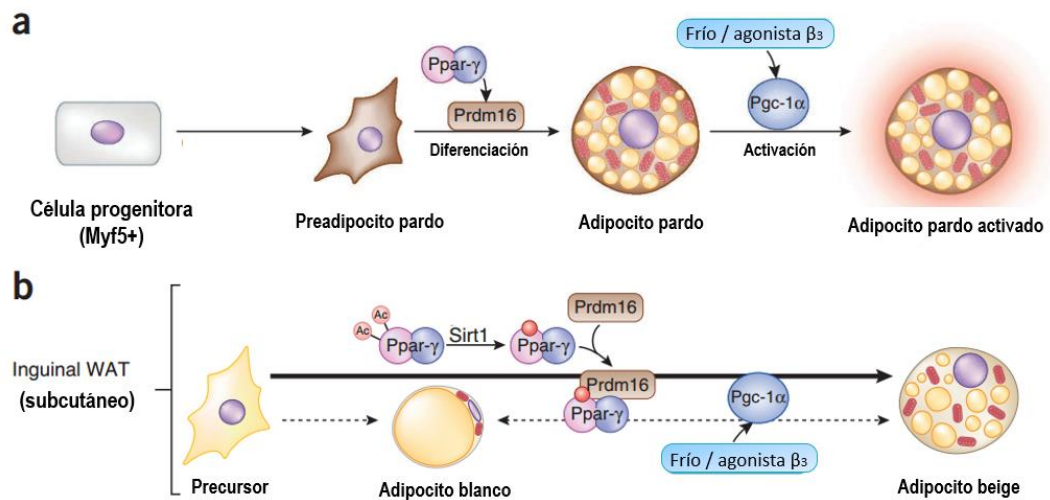


Figura 2. Regulación transcripcional del desarrollo de adipocitos pardos y beige. **(a)** Los adipocitos pardos derivan de una población progenitora que expresa Myf5. Ppar- γ promueve la expresión de Prdm16, que conduce a la adipogénesis parda. La termogénesis en adipocitos pardos maduros es activada por noradrenalina (NA), un agonista β_3 , liberado de las neuronas simpáticas. NA envía señales a través de β -adrenorreceptores para aumentar la expresión y la actividad de Pgc-1 α , un co-activador transcripcional que coordina la programación de genes termogénicos en respuesta a la activación. **(b)** En la grasa inguinal, la estimulación β -adrenérgica desencadena predominantemente la diferenciación *de novo* de las células precursoras. Bajo ciertos estímulos, los adipocitos blancos pueden transdiferenciarse en adipocitos beige. Adaptado de Matthew Harms & Patrick Seale (2013) [44].

1.3 Participación del Sistema nervioso simpático en la termogénesis

Un regulador fundamental del órgano adiposo es el sistema nervioso simpático (SNS), el cual inerva tanto el WAT como el BAT [23, 45, 46]. Los neurotransmisores característicos del SNS son las catecolaminas, en donde noradrenalina (NA) posee un rol fundamental en este tejido [47]. La NA es un modulador fisiológico de la proliferación y apoptosis adipocitaria, diferenciación del tejido, densidad de mitocondrias y cantidad de UCP1 [48], es decir, puede inducir la termogénesis en BAT.

Este neurotransmisor interactúa con los receptores adrenérgicos de tipo α y β , los cuales están asociados con la activación de diferentes vías de señalización en el tejido graso [48]; sin embargo, es importante indicar que los adrenoreceptores β (β ARs) son los más abundantes, siendo los subtipos β_1 y β_3 los más relevantes en preadipocitos y adipocitos pardos maduros, respectivamente [49]; no obstante, ambos se pueden coexpresar en adipocitos pardos maduros [50]. Los β ARs son miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteína G (GPCR), donde el β_3 AR interactúa con ambas proteínas Gs y Gi, mientras que β_1 AR se encuentra acoplado a proteína Gs [51]. La obesidad, tanto en roedores como en humanos, está asociada con altos niveles de NA y/o a una disminución de la respuesta β ARs a NA [52, 53]. Diversos estudios indican que la NA y agonistas β_3 ARs promueven la termogénesis y lipólisis, conduciendo a un mayor gasto energético y menor almacenamiento de grasa [54, 55]. Bachman y cols. (2002) establecieron que los ratones que carecen de β ARs presentaron una reducida tasa metabólica y desarrollo de obesidad debido al descenso de la termogénesis inducida por la dieta [56]. Por lo tanto, esta evidencia indica el importante rol del SNS en el desarrollo de la obesidad.

1.4 Metformina como posible tratamiento para prevenir el aumento de la prevalencia de la obesidad

La metformina es un euglicemiante de uso oral, comúnmente prescrito para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II. Su principal efecto farmacológico está mediado por la disminución de la gluconeogénesis hepática, pero se ha demostrado que mejora la sensibilidad a la insulina, el perfil lipídico, la función endotelial, el control del peso corporal y reduce la inflamación [57, 58].

En Chile, la metformina se utiliza como alternativa segura y efectiva en comparación con insulina, pero solo en mujeres con diabetes gestacional en quienes la dieta no logra un control adecuado de

la glicemia o en aquellas que rechazan el tratamiento con insulina [59], debido a que es un fármaco de categoría B en teratogenicidad según la FDA [60].

Según los datos expuestos anteriormente, existe evidencia concreta que apoya la asociación entre la obesidad materna y la alta ingesta de energía con la obesidad y la disfunción metabólica en la descendencia. El período fetal y neonatal son críticos para el desarrollo del BAT, en donde un estímulo podría generar un impacto a largo plazo sobre la funcionalidad de éste [61, 62]. Min Du y cols. (2016) evidenciaron que una dieta alta en grasas durante la lactancia aumenta la adiposidad, disminuye la sensibilidad a la insulina y tolerancia a la glucosa, y disminuye la termogénesis en las crías a las 16 semanas de edad, además de presentar una menor sensibilidad a agonistas β 3AR. No obstante, demostraron que la intervención temprana con metformina en las crías protege al BAT de esta alteración [63]. Así mismo, otros estudios demuestran que la exposición prenatal a la metformina cambió la respuesta de la descendencia a una dieta alta en grasa, mejorando la tolerancia a la glucosa y previniendo la acumulación de masa grasa, además de cambios en los genes implicados en la producción de ATP mitocondrial y en la diferenciación de adipocitos [64, 65].

Considerando todas estas evidencias, este estudio sugiere que la obesidad materna puede alterar la actividad simpática del BAT generando una modificación en la capacidad termogénica de este tejido mediante la reprogramación fetal, sin embargo, esta alteración podría ser prevenida mediante el tratamiento con metformina durante la gestación y lactancia de estas madres obesas, postulando así la siguiente hipótesis:

2 HIPÓTESIS

El tratamiento con metformina previo y durante la preñez y lactancia incrementa la capacidad termogénica del tejido adiposo pardo interescapular en la descendencia femenina adulta de ratas con obesidad inducida por dieta alta en grasas debido a aumento de la actividad del sistema nervioso simpático.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Evaluar los niveles de noradrenalina y de marcadores termogénicos en el tejido adiposo pardo de la descendencia adulta de madres obesas luego del tratamiento con metformina durante la gestación y lactancia, con el fin de evaluar la capacidad termogénica.

3.2 Objetivos Específicos

1. Determinar los niveles de noradrenalina en tejido adiposo pardo interescapular (iBAT) mediante ELISA en la descendencia adulta de ratas madres controles y obesas tratadas con metformina durante la preñez y lactancia.
2. Evaluar la expresión transcripcional de los adrenoreceptores β_1 y β_3 en el iBAT de la descendencia adulta de ratas madres controles y obesas tratadas con metformina durante la preñez y lactancia, mediante RT-PCR en tiempo real.
3. Evaluar la expresión transcripcional de genes termogénicos *Ppar γ* , *Prdm16* y *Pgc1 α* en el iBAT de la descendencia adulta de ratas madres controles y obesas tratadas con metformina durante la preñez y lactancia, mediante RT-PCR en tiempo real.
4. Determinar la expresión proteica y transcripcional de UCP1 en iBAT en la descendencia adulta de ratas madres controles y obesas tratadas con metformina durante la preñez y lactancia, mediante Western blot y RT-PCR en tiempo real.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Muestras utilizadas

Para este estudio se utilizó BAT extraído de la zona interescapular (iBAT) de ratas crías de madres obesas, debido a su tamaño, accesibilidad e importante inervación [23]. Estos tejidos se almacenaron a -80°C hasta su posterior utilización. Para cada grupo experimental se utilizaron los tejidos de 10 crías de diferentes madres.

4.2 Animales y dieta

Veinte ratas hembras de la cepa Sprague Dawley entre 150-200 g fueron alojadas en jaulas compartidas en la sala de mantención de animales del Instituto de Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso en un ambiente con temperatura controlada (20-22°C), con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas y se alimentaron con una dieta control (CD) con una densidad energética de 4 Kcal/g de alimento, la cual contiene 27% de las calorías totales en proteínas, 59,9% carbohidratos y 13,1% en lípidos (Rat diet #5012, Labdiet®, USA) o dieta alta en grasas (HF) con una densidad energética de 5 Kcal/g de alimento, la cual contiene 20% de las calorías totales en proteínas, 20% en carbohidratos y 60% en lípidos (High Fat Diet #12492, Researchdiets®, USA) y agua *ad libitum*. La composición de las respectivas dietas se encuentra en el anexo 9.1.

4.3 Diseño Experimental

Durante las 3 primeras semanas, las 20 ratas hembras fueron aclimatadas a las condiciones experimentales con dieta control y manipuladas con frecuencia antes del comienzo del experimento. Se registró diariamente el peso corporal, ingesta alimentaria (mediante la diferencia de peso del día anterior) y 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, dieta control (CD) o dieta

alta en grasas (HF); la dieta administrada se mantuvo hasta el período de destete correspondiente al día post-natal (PND) 21. Una semana antes del período de cruce, se reagruparon en 4 subgrupos (n=5): CD, CD+met, HF y HF+met; de los cuales 2, CD+met y HF+met, fueron tratadas adicionalmente con metformina. El tratamiento comprendió desde una semana antes del período de cruce y durante la preñez y lactancia hasta el PND 13 de las crías (período correspondiente al destete parcial de la cría). Luego de 4 semanas de CD o HF las ratas fueron cruzadas con machos reproductores de fertilidad probada alimentados con dieta control. La confirmación de la preñez se realizó mediante la observación de espermatozoides en el frotis vaginal u observación de ocho diestros consecutivos. Las crías (n=10), obtenidas de cada grupo, fueron sexadas al día PND 1 mediante observación genital. Posterior al período de destete (PND 21), las crías fueron separadas de sus madres y se mantuvieron con una dieta control hasta el día de sacrificio. Se sacrificaron mediante decapitación cervical a los 60 días de edad (figura 3). Al momento de la eutanasia se recolectó la sangre troncal y el tejido a utilizar (iBAT y RpAT), los cuales se almacenaron a -80°C hasta el día de experimentación. 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) (anexo 9.4).

4.4 Tratamiento con metformina

Para los grupos de ratas madres CD+met y HF+met, la metformina se administró por vía oral. El tratamiento farmacológico comenzó una semana antes de iniciar el período de cruce y se mantuvo hasta el día PND 14 de las crías, para imitar la situación metabólica en la que el tratamiento con metformina se utiliza en seres humanos. La dosificación en ratas es usualmente de 50 a 500 mg / Kg

[63]. Se administró 250 mg/Kg peso/día de metformina clorhidrato (metformina clorhidrato en polvo, preparado magistral, Farmacias Ecovital) en un vehículo de jalea; debido a que, según estudios previos del laboratorio de alteraciones reproductiva y metabólicas, el uso de jaleas tiene una mejor aceptabilidad por estos animales.

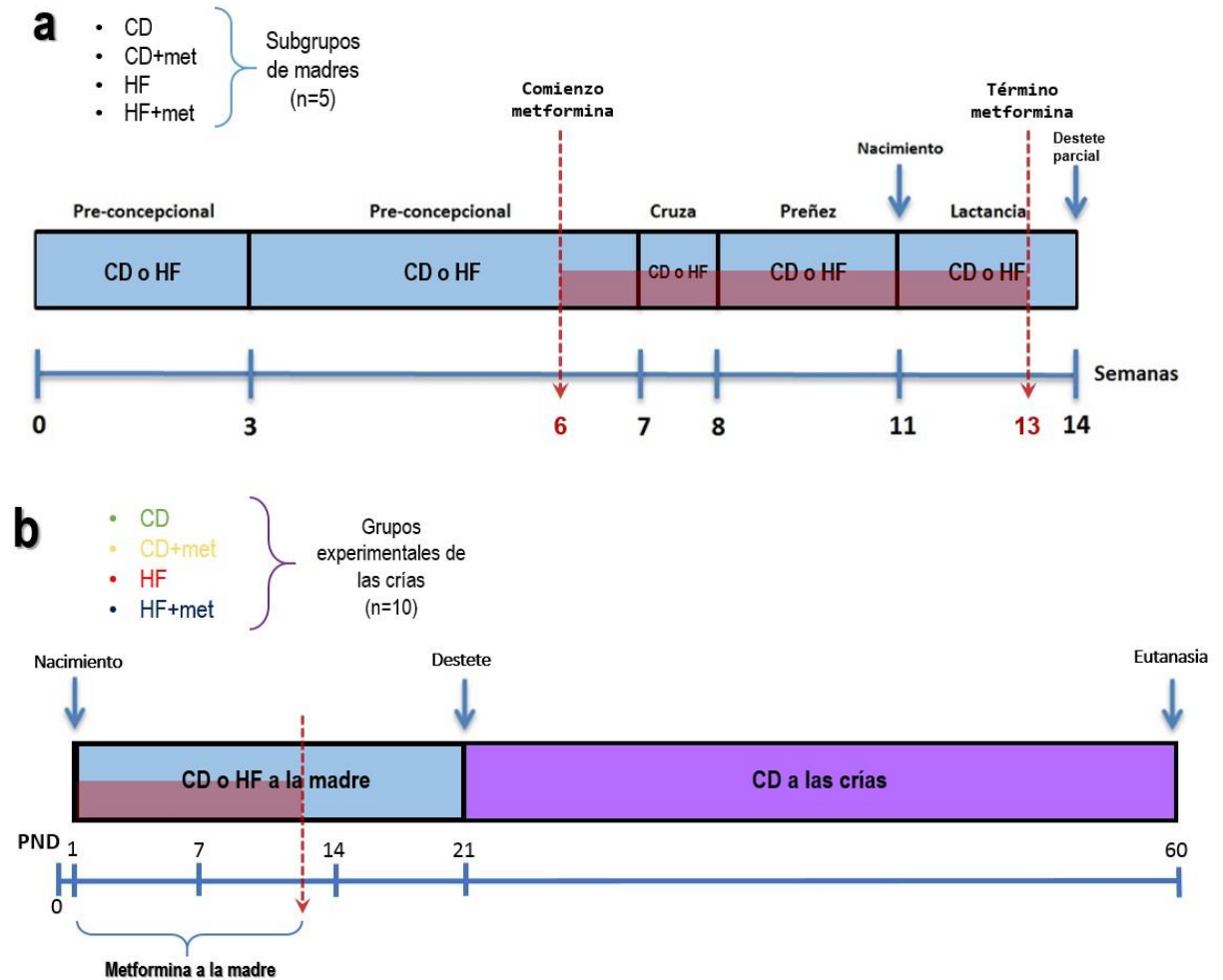


Figura 3. Esquema del modelo experimental de ratas madres e hijas. (a) Diseño de los 4 subgrupos experimentales de las madres (n=5): CD, CD+met, HF y HF+met, mostrando en la barra celeste la dieta (CD o HF) y en rojo el período adicional de tratamiento con metformina (CD+met o HF+met). (b) Diseño experimental de las crías de los diferentes grupos de madres. En la barra color celeste se muestra la dieta de las madres de estas ratas durante el período de lactancia y en rojo la etapa adicional de tratamiento con metformina de los subgrupos CD+met y HF+met. La dieta desde el destete hasta el PND 60 fue CD para todas las crías femeninas de los 4 subgrupos (barra color morada). Sin embargo, para mayor comprensión los grupos experimentales de las crías se nombran con la dieta de la madre.

4.5 Mediciones analíticas

4.5.1 Extracción de proteínas totales a partir de homogenizado de tejido adiposo.

Se utilizó tejido adiposo almacenado a -80°C para la obtención de proteínas. Las proteínas fueron aisladas a partir de 20-30 mg de tejido, el cual fue homogeneizado en vidrio-vidrio utilizando 10 veces el volumen de buffer de lisis RIPA con respecto al peso de tejido. El buffer consta de 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).

El homogenizado fue centrifugado a 17.000 g por 10 min y se recuperó el sobrenadante, almacenándose a -20 °C para su posterior cuantificación.

4.5.2 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de la concentración de proteínas se realizó mediante el método de Bradford, utilizando el kit Bio-Rad® Protein Assay (Coomassie Brilliant Blue G-250) como colorante de unión a proteínas. Para esta determinación se diluyó el sobrenadante en una proporción de 1:100 con agua destilada y se realizó la medición en un espectrofotómetro a una absorbancia de 595 nm. Cabe destacar que en esta dilución el buffer RIPA no interfiere con la determinación de proteínas.

Los resultados fueron obtenidos interpolando los valores de absorbancia en una curva de calibrado preparada a partir de albúmina de suero bovino (BSA, Santa Cruz Biotechnology®).

4.5.3 Determinación de los niveles relativos de UCP1 por Western blot.

Se realizó la separación de las proteínas presentes en la muestra mediante una electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) en condiciones denaturantes (5% gel concentrador, 12% gel resolutivo), cargando 30 µg de proteínas, las cuales migraron en un campo eléctrico de 80 V por 15

min seguido de 100 V por 2 h. Luego, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa por 2 h a 350mA. Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas con leche al 5% en TBS-T (Tween-20 al 0,1 % en solución de tris tamponada TBS – 20mM Tris, NaCl 137 mM) durante 1 h, para luego ser incubadas con anticuerpos primarios por una hora a temperatura ambiente. Éstos fueron: anticuerpo primario (conejo anti-ratón) anti-Ucp1 (ab10983, abcam®, UK) y β -Tubulina (ab6046, abcam®, UK) a una dilución de 1:10.000 en TBS-T. Después las membranas fueron lavadas con TBS-T e incubadas con el anticuerpo secundario IgG anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) desarrollado en burro (Jackson ImmunoResearch®, laboratories, INC. USA.) a una dilución de 1:10.000 en TBS-T. Para el revelado se utilizó el kit de quimioluminiscencia aumentada EZ-ECL® (Biological Industries) y para la detección el equipo EpiChemi3 Darkroom. Las fotos obtenidas fueron procesadas utilizando el software Image-J® (NIH).

4.5.4 Determinación de noradrenalina por ELISA

Se utilizó tejido adiposo almacenado a -80°C para la determinación de noradrenalina. Se homogeneizaron 20-30 mg de tejido adiposo en vidrio-vidrio utilizando 10 veces el volumen de buffer de extracción, el cual consta de 0,01 N HCl, 4 nM metabisulfito de sodio y 1mM de EDTA. Se utilizó el kit comercial de determinación de noradrenalina mediante ELISA de acuerdo a las instrucciones del fabricante (ImmuSmol®, France).

4.5.5 Determinación de la expresión de ARNm para los genes de interés en tejido graso por PCR en tiempo real.

- **Extracción de ARN:** Se utilizó 15-20 mg de tejido adiposo de las ratas hijas almacenado a -80°C para la purificación de ARN total. El tejido fue homogeneizado mediante vidrio-plástico con 500 μ L de reactivo TRizol® (Molecular Research Center®, Inc; USA) bajo campana de extracción. Luego se

agregaron 100 μ L de cloroformo para producir una separación de fases (acuosa/oleosa) agitando vigorosamente por 15 s e incubándolos a temperatura ambiente por 2-3 min, posteriormente se centrifugó a 12.000 g por 15 min a 4°C. Se removió la fase acuosa, que contiene el ARN, a un nuevo tubo para precipitar el ARN con 250 μ L de Isopropanol 100% por 10 min a temperatura ambiente y centrifugar a 12.000 g por 10 min a 4°C. Luego se descartó el sobrenadante y se lavó el ARN con 500 μ L de etanol 75% y se centrifugó a 7.500 g por 5 min a 4°C para después secar el pellet por 10 min. Se adicionó 30 μ L de agua libre de ARNasa para resuspender el ARN y se cuantificó en el espectrofotómetro de microplaca Epoch (Biotek instrument® Inc; USA).

- **Síntesis de ADNc:** 1,4 μ g del ARN extraído del iBAT fue transformado a ADNc, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcriptasa reversa (RT-PCR) en tiempo real. Para la síntesis de ADNc se utilizó una solución mix que consta de: enzima SuperScript II (Invitrogen®,USA), random primers (Invitrogen®, Usa), inhibidor de RNasa (Invitrogen®,USA) y dNTP's (Omega Bio-Tek®,Inc; Georgia), DTT y Agua libre de RNAasa. 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 1). Los productos amplificados fueron detectados con SyberGreen y se determinó la especificidad de cada producto con un análisis de la "curva de melting" para cada muestra, debido a que cada gen presenta una temperatura única de desapareamiento (meltingpoint).

Las muestras fueron analizadas por duplicado y el volumen de reacción fue de 10 μ L (2 μ L de muestra + 0,5 μ L de primer Fw 10 μ M + 0,5 μ L de primer Rv 10 μ M + 5 μ L 2X SYBR Green + 2 μ L agua libre de ARNasa). Se realizó un protocolo de amplificación de 45 ciclos (Tabla 2).

Los datos fueron analizados acorde al método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [66] utilizando *Gapdh* como gen constitutivo.

Tabla 1. Partidores específicos para los genes de interés (Integrated DNA Technologies®, Inc, USA)

Gen	Primer	Secuencia 5' – 3'	Longitud del amplicón
<i>Ucp1</i>	Forward Reverse	GCCGGGTTTTGCACCACACT CCAGGACCCGAGTCGCAGAA	180 pares de bases
β_3AR	Forward Reverse	TAGCAAGGAGCCTGACTTCTG TTGGTTCTGGAGAGTTGCGG	137 pares de bases
β_1AR	Forward Reverse	TCGTAGTGGGCAACGTGTTGGTGAT GTCTACCGAAGTCCAGAGCTACAGAA	132 pares de bases
<i>Ppary</i>	Forward Reverse	CACAATGCCATCAGGTTTGG GCTGGTCGATATCACTGGAGATC	82 pares de bases
<i>Prdm16</i>	Forward Reverse	AGCACGGTGAAGCCATTC GCGTGCATCCGCTTGTG	86 pares de bases
<i>Pgc1α</i>	Forward Reverse	GCGCCAGCCAACACTCA TGGGTGTGGTTTGCATGGT	74 pares de bases
<i>Gapdh</i>	Forward Reverse	GATGCCCCCATGTTTGTGAT GGTCATGAGCCCTTCCACAAT	151 pares de bases

Tabla 2: Fases del ciclo de amplificación para cada gen de interés.

Gen	Desnaturalización	Alineación	Elongación
<i>Ucp1</i>	95°C x 20 s	63°C x 20 s	72°C x 30 s
β_3AR	95°C x 20 s	60°C x 20 s	72°C x 20 s
β_1AR	95°C x 20 s	62°C x 20 s	72°C x 20 s
<i>Ppary</i>	95°C x 20 s	59°C x 20 s	72°C x 30 s
<i>Prdm16</i>	95°C x 20 s	59°C x 20 s	72°C x 30 s
<i>Pgc1α</i>	95°C x 20 s	64°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

4.6 Análisis estadístico

Durante esta investigación, se analizaron los datos mediante el software GraphPad Prism®, versión 6.01.

Los resultados obtenidos se expresaron en términos del promedio \pm error estándar de la media (E.E.M).

A través del test D'Agostino – Pearson se determinó la distribución de las variables, la que resultó ser normal en todos los casos. Para determinar diferencias entre las medias en los distintos grupos se realizó el test *t de Student* entre los distintos grupos a comparar. Para indicar diferencias estadísticamente significativas se utilizó un valor de $p < 0,05$ entre los grupos experimentales utilizándose los siguientes símbolos en el documento (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$).

5 RESULTADOS

Para una mayor claridad en la presentación de los resultados, éstos se organizan según los objetivos específicos de la tesis.

5.1 Objetivo 1.- *Determinar los niveles de noradrenalina en iBAT mediante ELISA en la descendencia adulta de ratas madres controles y obesas tratadas con metformina durante la preñez y lactancia.*

5.1.1 Concentración de noradrenalina en el tejido adiposo

La regulación del tejido adiposo, posee un importante componente dado por el SNS, por lo tanto, observar cambios en la actividad del SNS que inerva este tejido es importante para determinar si el tratamiento con metformina en las progenitoras tiene efectos beneficiosos a largo plazo en las crías de madres obesas.

Como se observa en la figura 4, la crías cuyas madres se alimentaron con dieta HF presentan una disminución significativa de la concentración de NA del iBAT con respecto a las crías cuyas madres se alimentaron con dieta CD. Este efecto producido por la dieta HF en las madres puede ser revertido con el tratamiento de metformina en la progenitora, donde se logra ver un aumento en la concentración de NA contenida en las vesículas de los terminales nerviosos simpáticos del IBAT. Para determinar si estos cambios en las concentraciones de NA fueron estadísticamente significativos se evaluó la cantidad en μg del neurotransmisor en la totalidad del iBAT. Como se aprecia en la figura 5 (a) no existen cambios significativos en la cantidad de NA entre los diferentes grupos experimentales. En concordancia con la figura anterior, en la figura 5 (b) se grafican los pesos del iBAT en mg, en donde se aprecia un aumento en peso del tejido del grupo HF versus al control.

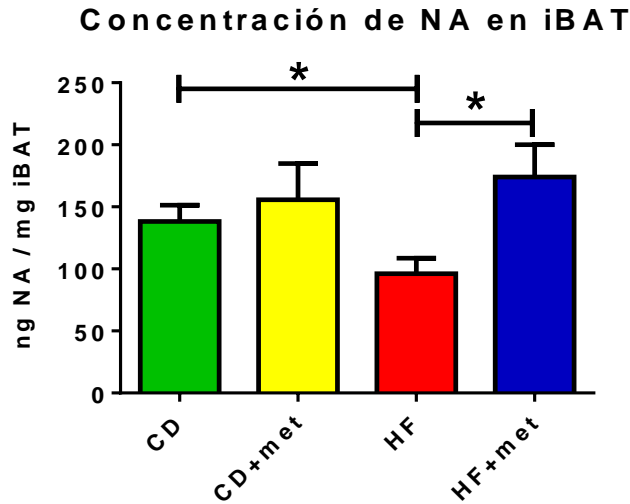


Figura 4. Concentración de NA en el tejido adiposo pardo interescapular (iBAT). En el gráfico se observan la concentración de NA con respecto al peso del iBAT. La barra representa el promedio \pm E.E.M. Los diferentes grupos experimentales están representados con colores, siendo la barra de color verde el grupo CD (n=10), en amarillo el grupo CD+met (n=9), rojo HF (n=8) y en azul HF+met (n=10). La significancia se obtuvo con un t-test de Student de una cola; $p < 0,05 = *$

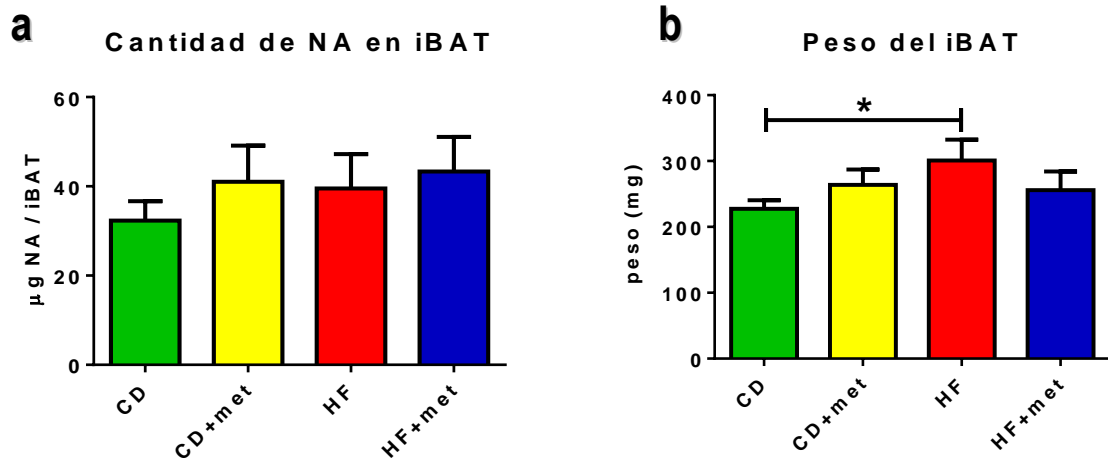


Figura 5. Cantidad de NA en el tejido adiposo pardo interescapular (iBAT). (a) En el gráfico se observa la cantidad total de NA en el iBAT. Los diferentes grupos experimentales están representados con colores, siendo la barra de color verde el grupo CD (n=10), en amarillo el grupo CD+met (n=9), rojo HF (n=9) y en azul HF+met (n=10). (b) **Peso del iBAT.** Los diferentes grupos experimentales están representados con colores, siendo la barra de color verde el grupo CD (n=10), en amarillo el grupo CD+met (n=10), rojo HF (n=9) y en azul HF+met (n=10). Los datos se grafican como el promedio \pm E.E.M. La significancia se obtuvo con un t-test de Student de una cola; $p < 0,05 = *$

5.2 Objetivo 2.- *Evaluar la expresión transcripcional de los adrenoreceptores β_1 y β_3 en el iBAT de la descendencia adulta de ratas madres controles y obesas tratadas con metformina durante la preñez y lactancia, mediante RT-PCR en tiempo real.*

5.2.1 Expresión transcripcional de β ARs en tejido de adiposo pardo

La inervación simpática juega un importante rol en la capacidad termogénica del BAT, ésto se evidencia por la alta densidad de adrenoreceptores β_1 y β_3 en preadipocitos y adipocitos maduros, respectivamente.

La expresión transcripcional de los β ARs fue analizada mediante RT-PCR en tiempo real. La figura 6 muestra los niveles relativos de ARNm de los β AR al PND 60 en las crías de los distintos grupos de madres. En la figura 6 (a) se observan los niveles relativos para β_1 AR, en donde se aprecia un aumento de la expresión en el grupo de crías HF+met con respecto al grupo CD y CD+met, además se logra apreciar una tendencia al alza con respecto al grupo HF. Sin embargo, para los resultados de la expresión génica de β_3 AR, figura 6 (b), se observa un perfil totalmente opuesto, en donde se distingue una disminución de los niveles de ARNm β_3 AR para el grupo de crías HF+met con respecto al grupo CD y CD+met.

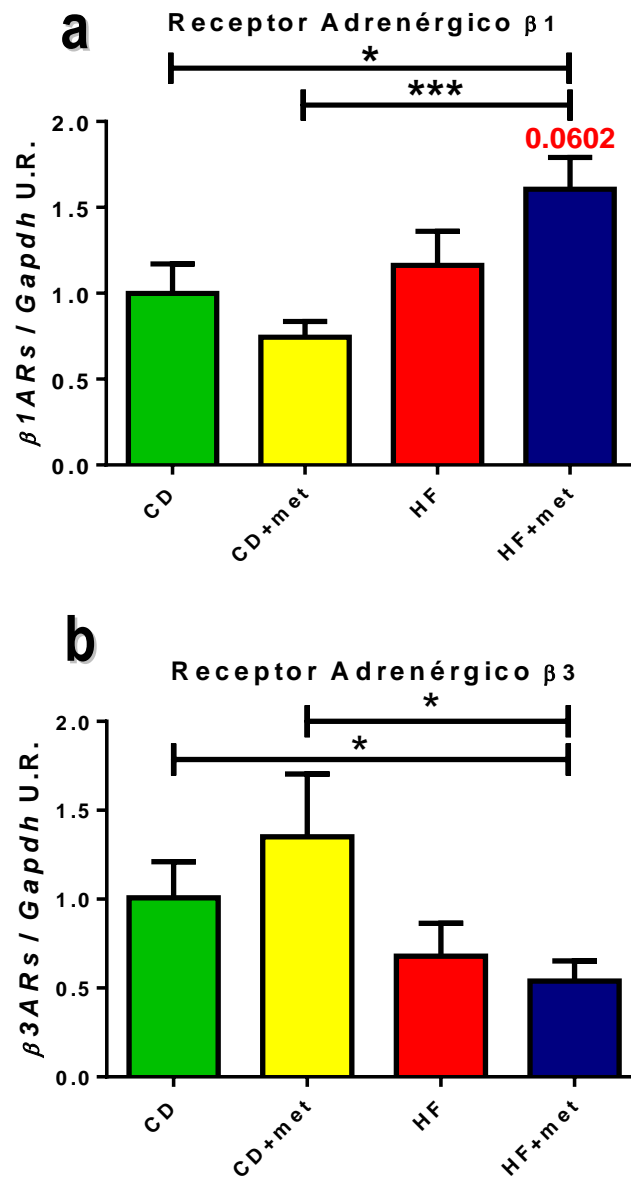


Figura 6. Expresión transcripcional de los β ARs en el tejido de grasa parda interescapular (iBAT). Los gráficos muestran los niveles relativos de ARNm de los β ARs mediante RT-PCR en tiempo real. La barra representa el promedio \pm E.E.M. **(a)** Muestra los niveles de ARNm para el $\beta 1AR$. Los diferentes grupos experimentales están representados con colores, siendo la barra de color verde el grupo CD (n=10), en amarillo el grupo CD+met (n=10), rojo HF (n=9) y en azul HF+met (n=9). El número en rojo sobre la barra HF+met indica el valor de p respecto a HF. La significancia se obtuvo con un t-test de Student de una cola; $p < 0,05 = *$; $p < 0,001 = ***$. **(b)** Muestra los niveles de ARNm para el $\beta 3AR$. Los diferentes grupos experimentales están representados con colores, siendo la barra de color verde el grupo CD (n=9), en amarillo el grupo CD+met (n=10), rojo HF (n=10) y en azul HF+met (n=9). La significancia se obtuvo con un t-test de Student de una cola; $p < 0,05 = *$

5.3 Objetivo 3.- Evaluar la expresión transcripcional de genes termogénicos *Ppar γ* , *Prdm16* y *Pgc1 α* en el iBAT de la descendencia adulta de ratas madres controles y obesas tratadas con metformina durante la preñez y lactancia, mediante RT-PCR en tiempo real.

5.3.1 Expresión de *Ppar γ* , *Prdm16* y *Pgc1 α* en el tejido de adiposo pardo

La capacidad termogénica está determinada por el número de adipocitos (proliferación versus apoptosis), diferenciación del tejido, densidad de mitocondrias y cantidad de UCP1. Para evaluar la diferenciación (preadipocitos a adipocitos) se determinaron los niveles relativos de ARNm para los genes *Ppar γ* y *Prdm16*. En la figura 7(a) se aprecia un aumento de la expresión de estos factores en el grupo de crías CD+met con respecto al CD y HF+met. En la figura 7(b) se observa el mismo patrón, pero adicionalmente, una disminución acentuada para el grupo HF+met con respecto al grupo CD+met y HF. No obstante, la tendencia entre ambos factores es similar entre los grupos.

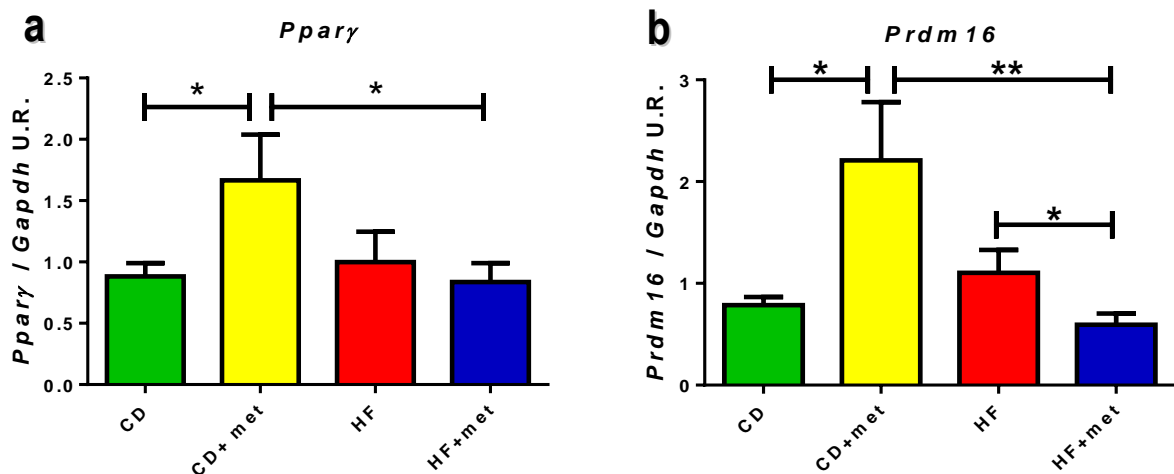


Figura 7. Expresión transcripcional de *Ppar γ* y *Prdm16* en el tejido de grasa parda interescapular (iBAT). (a) Muestra los niveles relativos de ARNm para *Ppar γ* . La barra representa el promedio \pm E.E.M. Los diferentes grupos experimentales están representados con colores, siendo la barra de color verde el grupo CD (n=9), en amarillo el grupo CD+met (n=10), rojo HF (n=10) y en azul HF+met (n=9). La significancia se obtuvo con un t-test de Student de una cola; $p < 0,05 = *$. (b) Muestra los niveles relativos de ARNm para *Prdm16*. La barra representa el promedio \pm E.E.M. Los diferentes grupos experimentales están representados con colores, siendo la barra de color verde el grupo CD (n=10), en amarillo el grupo CD+met (n=10), rojo HF (n=10) y en azul HF+met (n=9). La significancia se obtuvo con un t-test de Student de una cola; $p < 0,05 = *$; $p < 0,01 = **$

La termogénesis ocurre principalmente en la mitocondria del BAT, en donde PGC-1 cumple un rol fundamental en la biogénesis mitocondrial y aumento de la expresión de UCP1. La figura 8 muestra los niveles relativos de *Pgc1 α* , en donde se aprecia un aumento de la expresión génica en los grupos de crías de madres obesas con respecto al de las crías con dieta control. Además, se puede observar un aumento en el grupo de crías CD+met versus al CD.

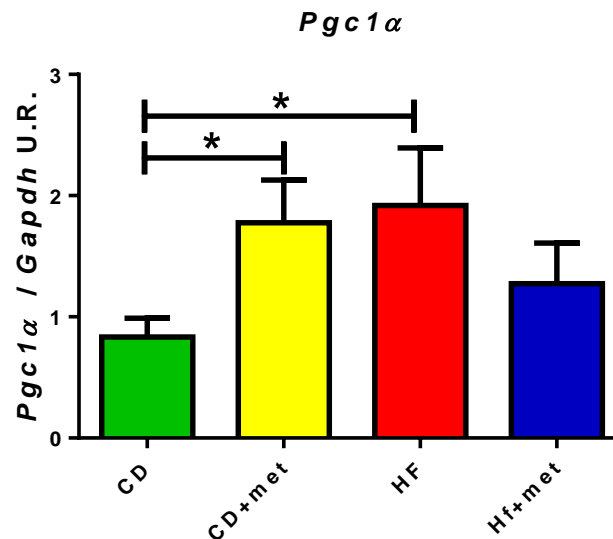


Figura 8. Expresión transcripcional de *Pgc1 α* en el tejido de grasa parda interescapular (iBAT). El gráfico muestra los niveles relativos de ARNm de *Pgc1 α* mediante RT-PCR en tiempo real. La barra representa el promedio \pm E.E.M. Los diferentes grupos experimentales están representados con colores, siendo la barra de color verde el grupo CD (n=9), en amarillo el grupo CD+met (n=10), rojo HF (n=10) y en azul HF+met (n=10). La significancia se obtuvo con un t-test de Student de una cola; $p < 0,05 = *$.

5.4 Objetivo 4.- Determinar la expresión proteica y transcripcional de UCP1 en iBAT en la descendencia adulta de ratas madres controles y obesas tratadas con metformina durante la preñez y lactancia, mediante Western blot y RT-PCR en tiempo real.

5.4.1 Expresión de Ucp1 en el tejido de adiposo pardo

La propiedad termogénica en adipocitos pardos se produce (i) por una mayor densidad mitocondrial y (ii) por la expresión específica de la proteína termogénica UCP1.

La figura 9 muestra los niveles de ARNm del gen que codifica para *Ucp1*. Se observa una disminución de la expresión génica de las crías de madres obesas versus a las crías de madres controles. Esta disminución también se logra ver en el grupo de las crías de madres obesas tratadas con metformina versus a las crías de madres controles.

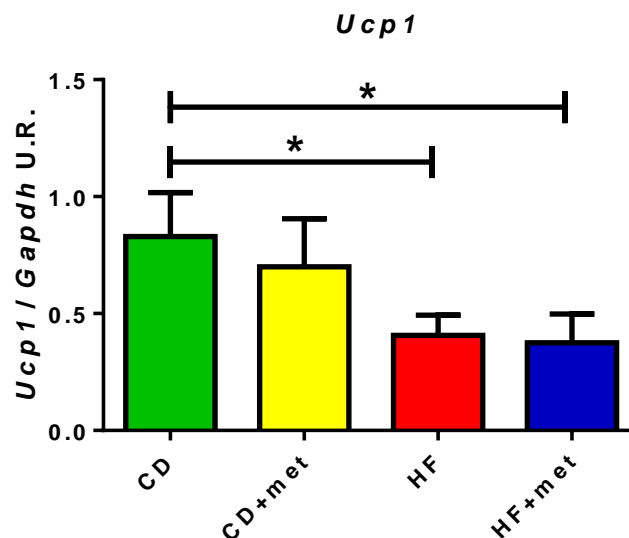


Figura 9. Expresión transcripcional de Ucp1 en el tejido de grasa parda interescapular (iBAT). El gráfico muestra los niveles relativos de ARNm del *Ucp1* mediante PCR en tiempo real. La barra representa el promedio \pm E.E.M. Los diferentes grupos experimentales están representados con colores, siendo la barra de color verde el grupo CD (n=9), en amarillo el grupo CD+met (n=10), rojo HF (n=10) y en azul HF+met (n=9). La significancia se obtuvo con un t-test de Student de una cola; $p < 0,05 = *$

Sin embargo, termogénesis en el BAT está estrechamente correlacionada con la cantidad de la proteína UCP1. Se consideró la cuantificación de UCP1 en lugar de su mRNA como un indicador más adecuado de la capacidad termogénica [67]. La figura 10 muestra los niveles relativos de la proteína UCP1, en donde se evidencia una disminución en las descendientes de madres obesas versus las descendientes de madres con dieta control.

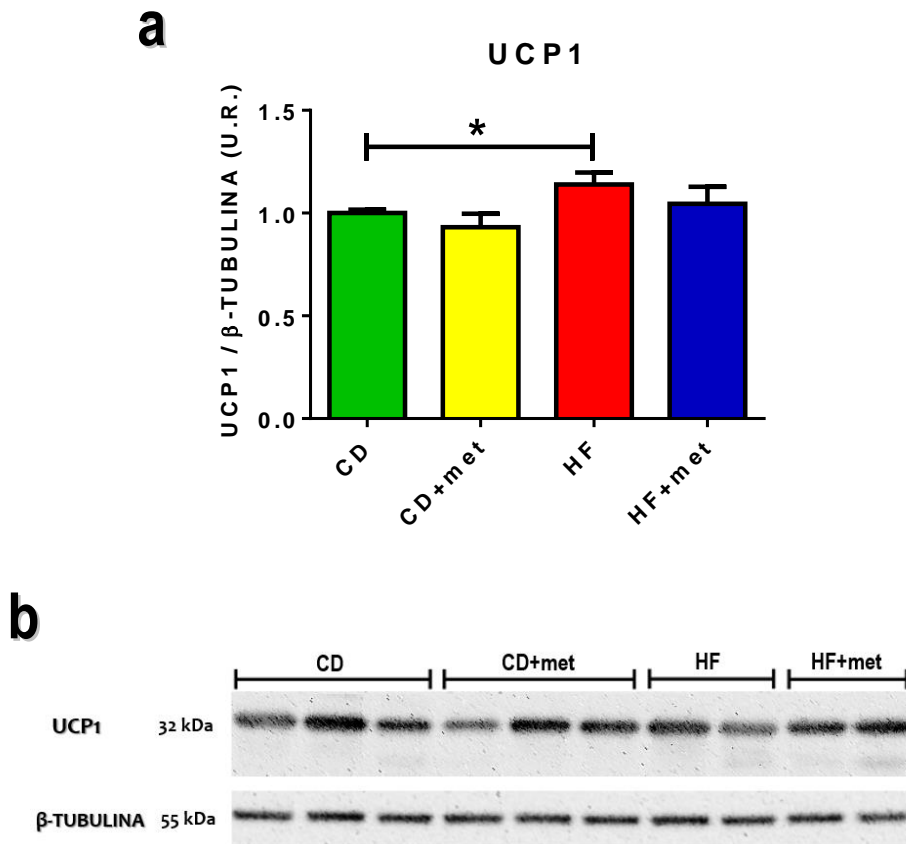


Figura 10. Expresión de UCP1 en el tejido de grasa parda interescapular (iBAT). (a) En el gráfico se observa los niveles relativos de Ucp1 en iBAT de ratas adultas descendientes de madres de distintos grupos experimentales en comparación con ratas descendientes de madres control. Los datos representados en el gráfico muestran el promedio \pm E.E.M. Los diferentes grupos experimentales están representados con colores, siendo la barra de color verde el grupo CD (n=9), en amarillo el grupo CD+met (n=8), rojo HF (n=10) y en azul HF+met (n=8). El valor de p sobre la barra HF indica su comparación con el control. La significancia se obtuvo con un t-test de Student de una cola; $p < 0,05 = *$. (b) Imagen representativa de los Western-Blots obtenidos para cada grupo experimental (CD, CD+met, HF, HF+met). Las bandas a 32 kDa representan a UCP1 y a 55 kDa β -TUBULINA.

6 DISCUSIÓN

Se ha descrito que un microambiente intrauterino obesogénico y/o diabetogénico predispone a fetos y recién nacidos a macrosomía, hipoglucemia y otras complicaciones perinatales [12-15]. Además, es importante destacar que este microambiente intrauterino alterado aumenta el riesgo de trastornos metabólicos posteriores en la descendencia [16-18]. En modelos experimentales, las alteraciones en la nutrición materna conducen a una modificación de la adipogénesis en la descendencia, incluyendo la promoción de un mayor número de células precursoras de adipocitos y un aumento en la expresión de los genes implicados en la adipogénesis blanca y parda [68]. Por lo tanto, es importante que en embarazos que cursan con diabetes gestacional se normalice el metabolismo materno con medidas terapéuticas como dieta, administración de insulina o, como algunos estudios sugieren, con metformina [69, 70].

En este trabajo se investigó si la administración de metformina en las madres, desde el período pregestacional hasta la lactancia, logra evitar las alteraciones deletéreas provocadas por la obesidad gestacional sobre la función termogénica de la descendencia femenina adulta. Para esto se utilizó un modelo animal de obesidad gestacional bien caracterizado por el Laboratorio de Alteraciones Reproductivas y Metabólicas (LARM) de la Universidad de Valparaíso [71].

En primer lugar, se evaluó el peso corporal de la descendencia para determinar si en este modelo experimental se logra evidenciar un impacto directo del ambiente materno sobre el fenotipo de la descendencia. En el anexo 9.2, es posible apreciar que las crías de madres alimentadas con dieta HF presentan un mayor peso corporal que la descendencia de madres control desde el nacimiento hasta el período de adultez (PND 57), concordando con resultados anteriores del LARM [72]. En este sentido, se ha demostrado que existe un incremento en la expresión de transportadores de

glucosa y aminoácidos en la placenta de madres sometidas a una dieta alta en grasa, lo que conduciría a un mayor traspaso de nutrientes desde la madre hacia el feto y alteraciones metabólicas en él [73]. Más aún, estudios en ratonas madres alimentadas con dieta HF durante el período de lactancia evidencian un aumento del contenido graso de la leche materna (triglicéridos en la leche: CD vs HF; $364 \pm 37,3$ vs $528 \pm 67,1$ mg/mL; $p < 0.05$) [63]. Adicionalmente, otros estudios del LARM evidenciaron un aumento de la concentración de leptina sérica en las descendientes adultas de madres con dieta HF [74], lo que refleja una mayor adiposidad en estas crías concordando con el aumento del peso del RpAT, el cual se utiliza como índice del porcentaje de grasa corporal (anexo 9.3) [75]. Si bien, existe una correlación de la dieta HF de las madres con el aumento de peso en la descendencia adulta, éste no está vinculado con una mayor ingesta de alimentos [64, 72], esto sugiere un menor gasto energético, el cual podría estar relacionado con una menor capacidad termogénica.

En la descendencia de madres tratadas con metformina, inesperadamente se observa una diferencia entre los pesos de los grupos con metformina dependiente de la dieta materna, en donde, las crías de madres CD+met tienen un menor peso al nacer; sin embargo, aumentan de peso en comparación al grupo de crías de madres con CD a medida que avanzan en edad hasta la adultez. Por el contrario, las descendientes de madres HF+met siempre mantienen un peso significativamente mayor que las crías de madres CD, e incluso son más pesadas al nacer que las crías de madres obesas sin administración de metformina. Se ha demostrado en ratones que la metformina presenta una buena penetración a través de la placenta, encontrándose una concentración de 174 ± 114 nmol/L en las madres y 130 ± 21 nmol/L en el feto 24-29 horas después de la última administración en las madres [64]. La exposición a metformina induce un estado similar al ayuno (restricción

calórica) debido que disminuye la síntesis de ATP aumentando la relación AMP/ATP y conduciendo a la activación de AMPK y LKB1 [76, 77]. Por tanto, es probable que la administración de metformina a madres gestantes en el modelo experimental planteado altere el metabolismo energético de la cría en desarrollo, de forma similar a la desnutrición prenatal.

La función termogénica del BAT está estrechamente regulada por la actividad del SNS y la señalización celular β -adrenérgica [46, 47, 53]. Se ha demostrado que tanto la NA, agonistas β ARs y agonistas específicos β 3AR estimulan la termogénesis y la lipólisis, generando un mayor gasto energético y una menor adiposidad [78, 79]. Para determinar la actividad del SNS sobre este tejido, se determinó la concentración de NA en los terminales nerviosos del iBAT. En la figura 4 se observa una disminución en la concentración de NA en las ratas descendientes de madres obesas, lo cual sugiere una menor actividad simpática en este tejido. Sin embargo, se evidenció un aumento del peso del iBAT en las crías de madres obesas respecto de ratas controles (figura 5b) lo cual podría estar subestimando la concentración de NA en el BAT de estas crías. No obstante, es necesario en un futuro realizar un estudio histológico del iBAT, en donde se determine la población de adipocitos presentes en el tejido (porcentaje de adipocitos blancos, beige y pardos), el tamaño de los adipocitos, y sus características histológicas para determinar si el aumento de peso del iBAT corresponde a un aumento del número de adipocitos o de su contenido lipídico. Independiente de esta limitación, al calcular la cantidad total de NA en el iBAT se aprecia una tendencia al aumento de NA en el grupo HF. En este sentido, sería interesante evaluar el recambio de NA en el iBAT, a través de la medición de sus metabolitos extracelulares normetanefrina, MHPG, DHPG y/o VMA, para evaluar la liberación de NA desde el tejido.

Se ha demostrado que la administración de leptina resulta en un aumento del recambio de NA en el iBAT induciendo la termogénesis [80]. La leptina activa neuronas del área retroquiasmática y el núcleo arqueado lateral, las cuales inervan neuronas preganglionares simpáticas en la médula espinal torácica, las que derivan sus proyecciones al tejido adiposo [81]. Por lo tanto, este aumento de NA en el iBAT (figura 4 y 5a) podría ser debido a un efecto indirecto del aumento de la leptina como ya se evidenció en otros estudios del LARM [74].

De acuerdo a su nivel de diferenciación, el iBAT expresa diferentes niveles de $\beta 1$ y $\beta 3$ -ARs, los cuales presentan diferentes funciones de acuerdo a su interacción con NA [50]. La NA estimula la lipólisis (vía $\beta 3$ AR) y la termogénesis (vía $\beta 1$ y $\beta 3$ -ARs) [48, 54, 55]. Se ha observado que CGP-20712A, un antagonista específico para $\beta 1$ -AR, en cultivos celulares de adipocitos pardos, disminuye la expresión génica de *Ucp1* con un mínimo efecto en la lipólisis [82]; sin embargo, el uso de un agonista $\beta 3$ -AR (CL-316,243) muestra un incremento en la lipólisis y en los niveles de ARNm para *Ucp1* [49, 54, 82]. Los resultados obtenidos en este estudio evidencian un perfil inverso en la expresión génica de los $\beta 1$ y $\beta 3$ -ARs en los distintos grupos experimentales, en donde se ve una disminución en el $\beta 3$ AR en el grupo HF+met con respecto al CD y CD+met (figura 6b), mientras que para $\beta 1$ AR (figura 6a) se ve un aumento en los mismos grupos. El evidente aumento de peso en los grupos HF y HF+met (anexo 9.2), sugiere que existe una disminución de la lipólisis originado por la disminución en la expresión de los $\beta 3$ -ARs, lo que pudiese estar afectando la función metabólica y termogénica de estas crías. A su vez, el aumento discreto del peso en las crías CD+met sugiere que la señalización $\beta 3$ -adrenérgica estaría estimulando mayormente la lipólisis que la termogénesis, como se ha evidenciado en otros trabajos [51].

Sin embargo, la capacidad termogénica del BAT es un proceso aún más complejo, en donde, si bien la participación de la NA es esencial, existen ciertas condiciones como el estrés por frío (4°C) y la exposición a una dieta alta en grasas ("termogénesis inducida por la dieta"), en donde la termogénesis del BAT se ve aumentada por medio del "reclutamiento del BAT" [48]. El reclutamiento del BAT es el resultado combinado de la proliferación y diferenciación, mitocondriogénesis, y el aumento de la proteína UCP1[48]. Como se mencionó previamente, si bien el BAT deriva de un linaje celular bipotencial Myf5+ al igual que el músculo esquelético, la expresión de PRDM16 es esencial para la diferenciación a adipocitos[42]. Seale y cols. (2008), demostraron que el aumento de la expresión de PRDM16 aumenta los niveles de ARNm para genes adipogénicos (*Pparγ* y *Fabp4*) y termogénicos (*Ucp1* y *Pgc1α*) específicos, mientras que decrece los niveles de genes miogénicos (*Myod* y *Myg*) [42]. La acción adipogénica de PRDM16 es dependiente de su interacción con PPARγ tanto en cultivos celulares como *in vivo* [83]. PPARγ es el regulador clave de la diferenciación adipogénica, siendo absolutamente necesario para inducir la adipogénesis. La figura 7 muestra los niveles relativos de la expresión de ARNm de *Prdm16* y *Pparγ*, donde se aprecia (para ambos factores) un aumento en el grupo CD+met con respecto al control y al HF+met. El incremento en la expresión de estos factores conduce a pensar en un proceso adipogénico activo para este grupo, es decir, mayor diferenciación de preadipocitos a adipocitos pardos. Este resultado concuerda con la tendencia al aumento de expresión del β1AR en el grupo HF+met comparado con el grupo HF (figura 6a), el cual se expresa mayoritariamente en preadipocitos. A su vez, sugiere que existe una mayor cantidad de adipocitos pardos maduros en las crías CD+met (aumento β3ARs y disminución de β1ARs).

El reclutamiento del BAT no solo requiere una mayor proliferación y diferenciación de adipocitos pardos, sino que además un mayor número de mitocondrias. PGC-1 α aumenta la expresión transcripcional de genes relacionados con la mitocondriogénesis, aumenta la actividad transcripcional de *Ppar γ* y además promueve la expresión de UCP1 [84]. En los resultados obtenidos para la expresión de *Pgc1 α* se observa un aumento de su expresión en el grupo HF y en el CD+met comparados al grupo CD. Este resultado coincide con que la expresión de *Pgc1 α* es inducida por el aumento de la actividad simpática a través de exposición al frío (4°C), inducción por dieta o con el uso de agonistas β AR (isoproterenol) [84]. Alternativamente, el incremento de la expresión de *Pgc1 α* en grupo de crías de madres obesas puede estar relacionado con un aumento de los niveles de leptina [85].

Finalmente, la termogénesis inducida por NA en BAT es absolutamente dependiente de UCP1 [86], por lo tanto, en este estudio se evaluó la expresión de UCP1. Sorpresivamente se encontró una menor expresión del gen de *Ucp1* (figura 9) para los grupos de crías de madres alimentadas con HF (con o sin tratamiento con metformina) versus al CD; por el contrario, se evidenció un aumento en la cantidad de proteína UCP1 (figura 10) en el grupo de crías de madres obesas comparado al control, es decir, la tendencia entre el ARNm y la proteína es inversa. Si bien, existe una buena correlación entre los niveles de ARNm de *Ucp1* y los niveles de proteína UCP1 [87], éste no es el caso durante las fases de transición alimenticia. Por ejemplo, el ayuno produce una disminución aguda [88] en los niveles de ARNm *Ucp1* (vida media variable según estímulo, entre 3-36 h [89]), a diferencia de los niveles proteicos (vida media de 3-5 días[67]). Estos hallazgos sugieren que, en este estudio, los niveles de ARNm disminuyen producto de que las ratas fueron eutanasiadas luego de 6-8 h de ayuno. En consecuencia, se consideraron solo los niveles proteicos para posteriores conclusiones.

El aumento de la expresión proteica de UCP1 en las descendientes adultas de madres obesas era esperable, debido a que se ha visto una elevación de la expresión UCP1 en el BAT en un ambiente de sobrenutrición postnatal en pequeñas camadas de ratas [62]. Si bien, las crías de madres obesas nacieron con más peso (anexo 9.2. figura b), en la adultez este aumento no fue tan drástico (anexo 9.2. figura f), lo cual podría implicar que el aumento del gasto energético mediante la termogénesis sería un mecanismo de defensa fisiológico ante la obesidad en estas crías, las cuales mantuvieron una dieta control durante todo el experimento luego del destete.

Una posible explicación para este fenómeno es el aumento de leptina en estas crías [74]. La capacidad termogénica aguda de la leptina está localizada en el BAT, resultando en un aumento de la actividad nerviosa simpática y del recambio de NA [80] y un aumento de la expresión génica de UCP1 y PGC-1 α [85]. Estos efectos mediados por la leptina sobre la expresión de UCP1 en el BAT son dependientes de la inervación simpática del tejido [90] y pueden llevarse a cabo equitativamente mediante la activación de β_1 / β_3 -ARs [91]. Por otra parte, la hormona insulina ejerce una acción directa sobre el BAT, donde ratones deficientes del receptor de insulina presentan un incremento en la masa del iBAT debido al aumento del almacenamiento de triglicéridos con una disfunción significativa de la capacidad termogénica traducida en intolerancia al frío[92]; además inhibe la expresión génica y acoplamiento a adenilato ciclasa del β_3 AR en adipocitos pardos[93], es decir, la insulina disminuye la capacidad de respuesta del BAT a las catecolaminas, lo cual podría alterar el control noradrenérgico de UCP1 y por tanto limitar la disipación de energía mediante la termogénesis. Es interesante notar que las ratas hijas de madres obesas también presentan un aumento de la insulinemia [72].

Finalmente, la exposición a metformina afecta la actividad adrenérgica y la expresión génica de factores termogénicos, sin lograr influir en la capacidad termogénica como tal, pero estos cambios parecieran estar afectados directamente por la dieta materna, sugiriendo así que este fármaco no mejoraría los efectos deletéreos de la dieta HF, más bien produciría un efecto sinérgico entre ambos. En consecuencia, es evidente que el estado metabólico materno durante la gestación y lactancia tiene un papel crucial en la determinación de cómo la exposición a la metformina prenatal se traduce en el fenotipo de la descendencia.

7 CONCLUSIÓN

Podemos señalar como resumen que:

1. La obesidad gestacional inducida por una dieta alta en grasa en ratas tiende a incrementar los niveles de NA en la descendencia femenina adulta. Por otra parte, el tratamiento con metformina durante la gestación y lactancia también produce un aumento de los niveles de NA en la descendencia femenina adulta independiente de la dieta materna.
2. La obesidad gestacional inducida por una dieta alta en grasa en ratas no modifica la expresión génica de los adrenoreceptores en las ratas hembras descendientes adultas. Sin embargo, la administración de metformina durante la gestación y lactancia aumenta la expresión génica de $\beta 1AR$, mientras que disminuye la expresión de $\beta 3AR$ en la descendencia adulta de madres obesas.
3. La obesidad gestacional inducida por una dieta alta en grasa en ratas aumenta la expresión génica de *Pgc1 α* . Por otra parte, el tratamiento con metformina incrementa la expresión de los factores termogénicos *Ppar γ* , *Prdm16* y *Pgc1 α* en las ratas descendientes de madres alimentadas con dieta control, mientras que disminuye la expresión de *Ppar γ* y *Prdm16* en crías de madres obesas.
4. La obesidad gestacional inducida por una dieta alta en grasa en ratas incrementa la expresión proteica de UCP1, mientras que el tratamiento con metformina durante la gestación y lactancia no modifica estos niveles en la descendencia adulta.

Conclusión General

La obesidad gestacional aumenta la adiposidad en la descendencia a largo plazo, sin embargo, estas crías presentan una activación de la capacidad termogénica, probablemente como mecanismo compensatorio contra el aumento de peso.

Por otro lado, el tratamiento con metformina a las madres durante la etapa gestacional y lactancia, pareciera actuar en las crías dependiendo de la dieta materna; en donde las crías de madres alimentadas con dieta control, presentan un aumento de peso corporal y lipólisis vía receptores β 3-adrenérgicos como un probable mecanismo compensatorio contra la obesidad. Por el contrario, la dieta materna de alto contenido graso en conjunto con administración de metformina tiene un efecto sinérgico entre el ambiente obesogénico generado por la dieta y el ambiente de “restricción calórica” formado por el fármaco en la madre, desactivando estos mecanismos compensatorios fisiológicos contra la obesidad.

8 BIBLIOGRAFÍA

1. Segula, D., *Complications of obesity in adults: A short review of literature*. Malawi Med J, 2014. **26 (1)**: 20-24.
2. Haslam, D.W. and James, W.P.T., *Obesity*. Lancet, 2005. **366(9492)**: 1197-1209.
3. OMS. 2016. *Sobrepeso y Obesidad*. <http://www.who.int>. (última visita Julio, 2017).
4. Gobierno de Chile. 2010. *Indicadores de Obesidad En Población Chilena*. <http://www.minsal.gob.cl> (última visita Julio, 2017).
5. Garmendia, M.L., Zamudio, C., Araya, M., and Kain, J., *Association between prepregnancy obesity and metabolic risk in Chilean premenopausal women 10 y postpartum*. Nutrition, 2017. **38**: 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. Teefey, C.P. and Durnwald, C.P., *Strategies to reduce disparities in maternal morbidity and mortality: The role of obesity and metabolic disease*. Semin Perinatol, 2017.
8. Chu, S.Y., Callaghan, W.M., Kim, S.Y., Schmid, C.H., Lau, J., England, L.J., and Dietz, P.M., *Maternal obesity and risk of gestational diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2007. **30(8)**: 2070-2076.
9. Henriksen, T., *The macrosomic fetus: a challenge in current obstetrics*. Acta Obstet Gynecol Scand, 2008. **87(2)**: 134-145.
10. Grio, R. and Porpiglia, M., *Obesity: internal medicine, obstetric and gynecological problems related to overweight*. Panminerva Med, 1994. **36(3)**: 138-141.
11. Huda, S.S., Brodie, L.E., and Sattar, N., *Obesity in pregnancy: prevalence and metabolic consequences*. Semin Fetal Neonatal Med, 2010. **15(2)**: 70-76.
12. Gunatilake, R.P. and Perlow, J.H., *Obesity and pregnancy: clinical management of the obese gravida*. Am J Obstet Gynecol, 2011. **204(2)**: 106-119.

13. Marchi, J., Berg, M., Dencker, A., Olander, E.K., and Begley, C., *Risks associated with obesity in pregnancy, for the mother and baby: a systematic review of reviews*. *Obes Rev*, 2015. **16**(8): 621-638.
14. McIntire, D.D., Bloom, S.L., Casey, B.M., and Leveno, K.J., *Birth weight in relation to morbidity and mortality among newborn infants*. *N Engl J Med*, 1999. **340**: 1234-1238.
15. Oken, E., Taveras, E.M., Kleinman, K.P., Rich-Edwards, J.W., and Gillman, M.W., *Gestational weight gain and child adiposity at age 3 years*. *Am J Obstet Gynecol*, 2007. **196**(4): 322 e321-328.
16. Catalano, P.M. and Ehrenberg, H.M., *The short- and long-term implications of maternal obesity on the mother and her offspring*. *BJOG*, 2006. **113**(10): 1126-1133.
17. Farias, M., *Obesidad materna: Severo problema de salud pública en Chile*. *Rev Chil Obstet Ginecol*, 2013. **6**: 409 - 412.
18. Gaillard, R., Santos, S., Duijts, L., and Felix, J.F., *Childhood Health Consequences of Maternal Obesity during Pregnancy: A Narrative Review*. *Ann Nutr Metab*, 2016. **69**(3-4): 171-180.
19. Godfrey, K.M., Reynolds, R.M., Prescott, S.L., Nyirenda, M., Jaddoe, V.W.V., Eriksson, J.G., and Broekman, B.F.P., *Influence of maternal obesity on the long-term health of offspring*. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2016. **5**(1): 53-64.
20. Stupin, J.H. and Arabin, B., *Overweight and obesity before, during and after pregnancy: part 1: Pathophysiology, molecular biology and epigenetic consequences*. *Geburtshilfe Frauenheilkd*, 2014. **74**(7): 639-645.
21. Lucas, A., *Programming by early nutrition in man. The childhood environment and adult disease*. *Child Environ adult Dis.*, 1991. **38-55**.
22. Samuelsson, A.M., Matthews, P.A., Argenton, M., Christie, M.R., McConnell, J.M., Jansen, E.H., Piersma, A.H., Ozanne, S.E., Twinn, D.F., Remacle, C., Rowlerson, A., Poston, L., and Taylor, P.D., *Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming*. *Hypertension*, 2008. **51**(2): 383-392.
23. Cinti, S., *Adipocyte differentiation and transdifferentiation: Plasticity of the adipose organ*. *J Endocrinol Invest*, 2002. **25**: 823-835.

24. Cinti, S., *The adipose organ*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2005. **73**(1): 9-15.
25. Cinti, S., *Adipose tissues and obesity*. Ital J Anat Embryol, 1999. **104**(2): 37-51.
26. Cedikova, M., Kripnerova, M., Dvorakova, J., Pitule, P., Grundmanova, M., Babuska, V., Mullerova, D., and Kuncova, J., *Mitochondria in white, brown, and beige adipocytes*. Stem Cells Int, 2016. **2016**: 6067349.
27. Cushman, S.W., *Structure-function relationships in the adipose cell. I. Ultrastructure of the isolated adipose cell*. J Cell Biol, 1970. **46**(2): 326-341.
28. Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. Nature, 1994. **372**: 425-431.
29. Friedman, J.M. and Halaas, J.L., *Leptin and the regulation of body weight in mammals*. Nature, 1998. **395**: 763-770.
30. Napolitano, L. and Fawcett, D., *The fine structure of brown adipose tissue in the newborn mouse and rat*. J Biophys Biochem Cytol, 1985. **4**: 685-690.
31. Ricquier, D. and Bouillaud, F., *Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance*. J Physiol, 2000. **15**: 3-10.
32. van der Lans, A.A., Wierds, R., Vosselman, M.J., Schrauwen, P., Brans, B., and van Marken Lichtenbelt, W.D., *Cold-activated brown adipose tissue in human adults: methodological issues*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2014. **307**(2): R103-113.
33. Cinti, S., *The role of brown adipose tissue in human obesity*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2006. **16**(8): 569-574.
34. Saito, M., Okamatsu-Ogura, Y., Matsushita, M., Watanabe, K., Yoneshiro, T., Nio-Kobayashi, J., Iwanaga, T., Miyagawa, M., Kameya, T., Nakada, K., Kawai, Y., and Tsujisaki, M., *High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity*. Diabetes, 2009. **58**(7): 1526-1531.
35. Seale, P. and Lazar, M.A., *Brown fat in humans: turning up the heat on obesity*. Diabetes, 2009. **58**(7): 1482-1484.
36. Brownlee, M., *Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications*. Nat Chem Biol, 2001. **414**: 813-820.

37. Cinti, S., *Reversible physiological transdifferentiation in the adipose organ*. Proc Nutr Soc, 2009. **68**(4): 340-349.
38. Vitali, A., Murano, I., Zingaretti, M.C., Frontini, A., Ricquier, D., and Cinti, S., *The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes*. J Lipid Res, 2012. **53**(4): 619-629.
39. Cohen, P., Levy, J.D., Zhang, Y., Frontini, A., Kolodin, D.P., Svensson, K.J., Lo, J.C., Zeng, X., Ye, L., Khandekar, M.J., Wu, J., Gunawardana, S.C., Banks, A.S., Camporez, J.P., Jurczak, M.J., Kajimura, S., Piston, D.W., Mathis, D., Cinti, S., Shulman, G.I., Seale, P., and Spiegelman, B.M., *Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch*. Cell, 2014. **156**(1-2): 304-316.
40. Timmons, J.A., Wennmalm, K., Larsson, O., Walden, T.B., Lassmann, T., Petrovic, N., Hamilton, D.L., Gimeno, R.E., Wahlestedt, C., Baar, K., Nedergaard, J., and Cannon, B., *Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(11): 4401-4406.
41. Nedergaard, J., Petrovic, N., Lindgren, E.M., Jacobsson, A., and Cannon, B., *PPARgamma in the control of brown adipocyte differentiation*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1740**(2): 293-304.
42. Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., Scime, A., Devarakonda, S., Conroe, H.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Rudnicki, M.A., Beier, D.R., and Spiegelman, B.M., *PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch*. Nature, 2008. **454**(7207): 961-967.
43. Bostrom, P., Wu, J., Jedrychowski, M.P., Korde, A., Ye, L., Lo, J.C., Rasbach, K.A., Bostrom, E.A., Choi, J.H., Long, J.Z., Kajimura, S., Zingaretti, M.C., Vind, B.F., Tu, H., Cinti, S., Hojlund, K., Gygi, S.P., and Spiegelman, B.M., *A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis*. Nature, 2012. **481**(7382): 463-468.
44. Harms, M. and Seale, P., *Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential*. Nat Med, 2013. **19**(10): 1252-1263.
45. Bartness, T.J. and Bamshad, M., *Innervation of mammalian white adipose tissue: implications for the regulation of total body fat*. Am J Physiol, 1988. **44**: 1399-1411.
46. Nnodim, J.O. and Lever, J.D., *Neural and vascular provisions of rat interscapular brown adipose tissue*. Am J Anat, 1988. **182**: 283-293.

47. Lever, J.D., Mukherjee, S., Norman, D., Symons, D., and Jung, R.T., *Neuropeptide and noradrenaline distributions in rat interscapular brown fat and in its intact and obstructed nerves of supply*. J Auton Nerv Syst, 1988. **25**: 15-25.
48. Cannon, B. and Nedergaard, J., *Brown adipose tissue: Function and physiological significance*. Physiol Rev, 2004. **1**(84): 277-359.
49. Grujic, D., Susulic, V.S., Harpe, M.-E., Himms-Hagen, J., Cunningham, B.A., Corkey, B.E., and Lowell, B.B., *β 3-Adrenergic receptors on white and brown adipocytes mediate β 3-selective agonist-induced effects on energy expenditure, insulin secretion, and food intake*. J Biol Chem, 1997. **272**(11): 17686-17693.
50. Granneman, J.G. and Lahners, K.N., *Differential adrenergic regulation of β 1- and β 3-adrenoceptor messenger ribonucleic acids in adipose tissue*. Endocrinology, 1992. **130**: 109-114.
51. Chaudhry, A., MacKenzie, R.G., Georgic, L.M., and Granneman, J.G., *Differential interaction of beta 1- and beta 3-adrenergic receptors with Gi in rat adipocytes*. Cell Signal, 1994. **4**(6): 457-465.
52. Himms-Hagen, J., *The role of brown adipose tissue in the calorogenic effect of adrenaline and noradrenaline in cold-acclimated rats*. J Physiol, 1969. **205**: 393-403.
53. Snitker, S., Macdonald, I., Ravussin, E., and Astrup, A., *The sympathetic nervous system and obesity: role in a etiology and treatment*. Obes Rev, 2000. **1**: 5-15.
54. Xiao, C., Goldgof, M., Gavrilo, O., and Reitman, M.L., *Anti-obesity and metabolic efficacy of the beta3-adrenergic agonist, CL316243, in mice at thermoneutrality compared to 22 degrees C*. Obesity (Silver Spring), 2015. **23**(7): 1450-1459.
55. Klaus, S., Seivert, A., and Boeuf, S., *Effect of the beta3-adrenergic agonist CL316,243 on functional differentiation of white and brown adipocytes in primary cell culture*. Biochimica et Biophysica Acta, 2001. **1539**: 85-92.
56. Bachman, E.S., Dhillon, H., Zhang, C.Y., Cinti, S., Bianco, A.C., Kobilka, B.K., and Lowell, B.B., *betaAR signaling required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance*. Science, 2002. **297**(5582): 843-845.
57. Rena, G., Pearson, E.R., and Sakamoto, K., *Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights?* Diabetologia, 2013. **56**(9): 1898-1906.

58. Hur, K.Y. and Lee, M.S., *New mechanisms of metformin action: Focusing on mitochondria and the gut*. J Diabetes Investig, 2015. **6**(6): 600-609.
59. *Gobierno de Chile. 2014. Guía de diabetes y embarazo*. <http://web.minsal.cl/> (última visita: Agosto, 2017).
60. Figueroa, J., Concha, J., and Peñaranda, C., *Guía de Clasificación Teratogénica FDA. Santiago de Chile*. 2012.
61. Yang, Q., Liang, X., Sun, X., Zhang, L., Fu, X., Rogers, C., Berim, A., Zhang, S., Wang, B., Foretz, F., Gang, D., Rodgers, B., and Du, M., *AMPK/alfa-ketoglutarate axis dynamically mediates DNA demethylation in the Prdm16 promoter and brown adipogenesis*. Cell Metab, 2016. **24**: 542-554.
62. Xiao, X.Q., Williams, S.M., Grayson, B.E., Glavas, M.M., Cowley, M.A., Smith, M.S., and Grove, K.L., *Excess weight gain during the early postnatal period is associated with permanent reprogramming of brown adipose tissue adaptive thermogenesis*. Endocrinology, 2007. **148**(9): 4150-4159.
63. Liang, X., Yang, Q., Zhang, L., Maricelli, J.W., Rodgers, B.D., Zhu, M.J., and Du, M., *Maternal high-fat diet during lactation impairs thermogenic function of brown adipose tissue in offspring mice*. Sci Rep, 2016. **6**: 34345.
64. Salomaki, H., Vahatalo, L.H., Laurila, K., Jappinen, N.T., Penttinen, A.M., Ailanen, L., Ilyasizadeh, J., Pesonen, U., and Koulu, M., *Prenatal metformin exposure in mice programs the metabolic phenotype of the offspring during a high fat diet at adulthood*. PLoS One, 2013. **8**(2): e56594.
65. Salomaki, H., Heinaniemi, M., Vahatalo, L.H., Ailanen, L., Eerola, K., Ruohonen, S.T., Pesonen, U., and Koulu, M., *Prenatal metformin exposure in a maternal high fat diet mouse model alters the transcriptome and modifies the metabolic responses of the offspring*. PLoS One, 2014. **9**(12): e115778.
66. Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method*. Methods, 2001. **25**: 402-408.
67. Nedergaard, J. and Cannon, B., *UCP1 mRNA does not produce heat*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1831**(5): 943-949.
68. Symonds, M.E., Sebert, S.P., Hyatt, M.A., and Budge, H., *Nutritional programming of the metabolic syndrome*. Nat Rev Endocrinol, 2009. **5**(11): 604-610.

69. Coetzee, E.J. and Jackson, W.P., *Metformin in management of pregnant insulin-independent diabetics*. Diabet Med, 1979. **16**: 241-245.
70. Gray, S.G., McGuire, T.M., Cohen, N., and Little, P.J., *The emerging role of metformin in gestational diabetes mellitus*. Diabetes Obes Metab, 2017. **19**(6): 765-772.
71. Ambrosetti, V., Guerra, M., Ramirez, L.A., Reyes, A., Alvarez, D., Olguín, S., González, D., Fernandois, D., Sotomayor, R., and Cruz, G., *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.
72. Alvarez, D. and Olguín, S., *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 nutricionista, Universidad de Valparaíso*. 2015.
73. Jansson, T. and Powell, T.L., *Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches*. Clin Sci (Lond), 2007. **113**(1): 1-13.
74. 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. Tesis para optar al título de nutricionista. Universidad de Valparaíso, Chile*. 2016.
75. Reed, D., Duke, F., Ellis, H., Rosazza, M., Lawler, M., Alarcon, L., and Tordoff, M., *Body fat distribution and organ weights of 14 common strains and a 22-strain consomic panel of rats*. Physiology & behavior, 2011. **103**: 523-529.
76. Dhahbi, J.M., Mote, P.L., Fahy, G.M., and Spindler, S.R., *Identification of potential caloric restriction mimetics by microarray profiling*. Physiol Genomics 2005. **23**: 343-350.
77. Onken, B. and Driscoll, M., *Metformin induces a dietary restriction-like state and the oxidative stress response to extend C. elegans healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1*. PLoS One, 2010. **5**: e8758.
78. Atgié, C., Faintrenie, G., Carpené, C., Bukowiecki, L.J., and Gélöën, A., *Effects of chronic treatment with noradrenaline or a specific beta3-adrenergic agonist, CL 316,243, on energy expenditure and epididymal adipocyte lipolytic activity in rat*. Comp Biochem Physiol, 1998. **119**: 629-636.
79. Canová, N.K., Lincová, D., Kmonibková, E., Kameníková, L., and Farghali, H., *Nitric oxide production from rat adipocytes is modulated by beta3-adrenergic receptor agonists and is involved in a cyclic AMP-dependent lipolysis in adipocytes*. Nitric Oxide 2006. **14**: 200-211.

80. Collins, S., Kuhn, C.M., Petro, A.E., Swick, A.G., Chrnyk, B.A., and Surwit, R.S., *Role of leptin in fat regulation*. Nature, 1996. **380**: 677-677.
81. Elias, C.F., Lee, C., Kelly, J., Aschkenasi, C., Ahima, R.S., Couceyro, P.R., Kuhar, M.J., Saper, C.B., and Elmquist, J.K., *Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord*. Neuron, 1998. **21**: 1375-1385.
82. Chaudhry, A. and Granneman, J.G., *Differential regulation of functional responses by b-adrenergic receptor subtypes in brown adipocytes*. Am J Physiol 1999(300): 147-153.
83. Rosen, E.D., Sarraf, P., Troy, A.E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D.S., Spiegelman, B.M., and Mortensen, R.M., *PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro*. Mol Cell, 1999. **4**: 611-617.
84. Puigserver, P., Wu, Z., Park, C., Graves, R., Wright, M., and Spiegelman, B.M., *A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis*. cell, 1998. **92**: 829-839.
85. Kakuma, T., Wang, Z.W., Pan, W., Unger, R.H., and Zhou, Y.T., *Role of leptin in peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 expression*. Endocrinology, 2000. **141**: 4576-4582.
86. Matthias, A., Ohlson, K.B., Fredriksson, J.M., Jacobsson, A., Nedergaard, J., and Cannon, B., *Thermogenic responses in brown fat cells are fully UCP1-dependent. UCP2 or UCP3 do not substitute for UCP1 in adrenergically or fatty acid-induced thermogenesis*. J Biol Chem, 2000. **275**(33): 25073-25081.
87. Jacobsson, A., Mühleisen, M., Cannon, B., and Nedergaard, J., *The uncoupling protein thermogenin during acclimation: indications for pretranslational control*. Am J Physiol, 1994. **267**: 999-1007.
88. Sivitz, W.I., Fink, B.D., and Donohoue, P.A., *Fasting and leptin modulate adipose and muscle uncoupling protein: Divergent effects between messenger ribonucleic acid and protein expression* Endocrinology, 1999. **140**: 1511-1519.
89. Jacobsson, A., Cannon, B., and Nedergaard, J., *Physiological activation of brown adipose tissue destabilizes thermogenin mRNA*. Science, 1987. **224**: 353-356.
90. Commins, S.P., Marsh, D.J., Thomas, S.A., Watson, P.M., Padgett, M.A., Palmiter, R., and Gettys, T.W., *Norepinephrine is required for leptin effects on gene expression in brown and white adipose tissue*. Endocrinology, 1999. **140**: 4772-4778.

91. Commins, S.P., Watson, P.M., Levin, N., Beiler, R.J., and Gettys, T.W., *Central leptin regulates the UCP1 and ob genes in brown and white adipose tissue via different beta-adrenoceptor subtypes*. J Biol Chem, 2000. **275**: 33059–33067.
92. Boucher, J., Softic, S., Ouaamari, A., Krumpoch, M., Kleinridders, A., Kulkarni, R.N., O'Neill, B., and Kahn, C.R., *Differential roles of Insulin and IGF-1 receptors in adipose tissue development and function*. Diabet Med, 2016: 1-46.
93. Hadri, K., Charon, C., Pairault, J., Hauguel-de-Mouzon, S., Quignard, A., and Feve, B., *Down-regulation of β 3-adrenergic receptor expression in rat adipose tissue during the fasted/fed transition: evidence for a role of insulin*. Bio chem J, 1997. **323**: 359-364.

9 ANEXOS

9.1 Composición de la dieta control y la dieta alta en grasas de las ratas.

-Dieta Control (CD)

Rat Diet

5012*

DESCRIPTION

Rat Diet is specifically designed to support reproduction, lactation, growth and maintenance of rats. This diet is a complete life cycle diet formulated using managed formulation, delivering Constant Nutrition®. This is paired with the selection of highest quality ingredients to assure minimal inherent biological variation in long-term studies. It is low in cholesterol content, with an increased level of unsaturated fatty acids over other rodent diets.

Features and Benefits

- Managed Formulation delivers Constant Nutrition®
- Highly digestible formula specifically for rats
- Low cholesterol
- High quality fish meal and plant proteins added to create a superior balance of amino acids for optimum performance

Product Forms Available

- Oval pellet, 10 mm x 16 mm x 25 mm length (3/8"x5/8"x1")
- Meal (ground pellets)

GUARANTEED ANALYSIS

Crude protein not less than	22.0%
Crude fat not less than	4.0%
Crude fiber not more than	5.0%
Ash not more than	8.0%
Moisture not more than	12.0%

INGREDIENTS

Ground corn, dehulled soybean meal, fish meal, wheat middlings, cane molasses, dehydrated alfalfa meal, soybean oil, ground oats, dried beet pulp, wheat germ, brewers dried yeast, dicalcium phosphate, calcium carbonate, salt, DL-methionine, choline chloride, cholecalciferol, menadione dimethylpyrimidinol bisulfite (source of vitamin K), pyridoxine hydrochloride, vitamin A acetate, biotin, thiamine mononitrate, vitamin B₁₂ supplement, dl-alpha tocopheryl acetate (form of vitamin E), nicotinic acid, calcium pantothenate, riboflavin supplement, manganese oxide, zinc oxide, ferrous carbonate, copper sulfate, zinc sulfate, calcium iodate, cobalt carbonate.

FEEDING DIRECTIONS

Provide feeders large enough to hold two to three days supply of Rat Diet at any time. Arrange feeders so that animals cannot contaminate feed with feces. Keep plenty of clean, fresh water available to the animals at all times.

Rats- All rats will eat varying amounts of feed depending on their genetic origin. Larger strains will eat up to 30 grams per day. Smaller strains will eat up to 15 grams per day. Feeders in rat cages should be designed to hold two to three days supply of feed at one time.

For information regarding shelf life please visit www.labdiet.com.

CHEMICAL COMPOSITION¹

Nutrients²			
Protein, %	23.2	Sulfur, %	0.32
Arginine, %	1.49	Sodium, %	0.28
Cystine, %	0.38	Chloride, %	0.51
Glycine, %	1.13	Fluorine, ppm	21
Histidine, %	0.60	Iron, ppm	260
Isoleucine, %	0.97	Zinc, ppm	387
Leucine, %	1.81	Manganese, ppm	78
Lysine, %	1.36	Copper, ppm	14
Methionine, %	0.60	Cobalt, ppm	0.64
Phenylalanine, %	1.05	Iodine, ppm	1.0
Tyrosine, %	0.70	Chromium (added), ppm	0.01
Threonine, %	0.88	Selenium, ppm	0.39
Tryptophan, %	0.26		
Valine, %	1.07	Vitamins	
Serine, %	1.13	Carotene, ppm	1.8
Aspartic Acid, %	2.59	Vitamin K, ppm	1.3
Glutamic Acid, %	4.67	Thiamin Hydrochloride, ppm	12
Alanine, %	1.37	Riboflavin, ppm	4.5
Proline, %	1.46	Niacin, ppm	80
Taurine, %	0.03	Pantothenic Acid, ppm	13
Fat (ether extract), %	5.0	Choline Chloride, ppm	1900
Fat (acid hydrolysis), %	6.4	Folic Acid, ppm	1.0
Cholesterol, ppm	174	Pyridoxine, ppm	6.5
Linoleic Acid, %	2.24	Biotin, ppm	0.3
Linolenic Acid, %	0.27	B ₁₂ , mcg/kg	51
Arachidonic Acid, %	0.01	Vitamin A, IU/gm	12
Omega-3 Fatty Acids, %	0.46	Vitamin D ₃ (added), IU/gm	3.4
Total Saturated Fatty Acids, %	0.73	Vitamin E, IU/kg	35
Total Monounsaturated		Ascorbic Acid, mg/gm	—
Fatty Acids, %	0.99		
Fiber (Crude), %	3.9	Calories provided by:	
Neutral Detergent Fiber ³ , %	13.3	Protein, %	27.020
Acid Detergent Fiber ⁴ , %	4.9	Fat (ether extract), %	13.103
Nitrogen-Free Extract		Carbohydrates, %	59.877
(by difference), %	51.4		
Starch, %	28.6		
Glucose, %	0.27		
Fructose, %	0.32		
Sucrose, %	3.45		
Lactose, %	0.00		
Total Digestible Nutrients, %	76.0		
Gross Energy, kcal/gm	4.15		
Physiological Fuel Value⁵, kcal/gm	3.43		
Metabolizable Energy, kcal/gm	3.07		
Minerals			
Ash, %	6.4		
Calcium, %	0.95		
Phosphorus, %	0.74		
Phosphorus (non-phytate), %	0.45		
Potassium, %	1.15		
Magnesium, %	0.21		

-Dieta alta en grasas (HF)

Open formula purified diets for lab animals

**Product Data - D12492**

Report ▶ Repeat ▶ Revise

Description

Rodent Diet with 60% kcal% fat.

Used in Research

Fatty Liver
Inflammation
Obesity
Diabetes

Packaging

Product is packed in 12.5 kg box.
Each box is identified with the product name, description, lot number and expiration date.

Lead Time

IN-STOCK.
Ready for next day shipment.

Gamma-Irradiation

Yes. Add 10 days to delivery time.

Form

Pellet, Powder, Liquid

Shelf Life

Most diets require storage in a cool dry environment. Stored correctly they should last 6 months.
Because of the high fat content is best if kept frozen.

Control Diets

D12450B, D12450J, D12450K

Formula

Product #D12492	gm%	kcal%
Protein	26.2	20
Carbohydrate	26.3	20
Fat	34.9	60
Total kcal/gm	5.24	100
Ingredient	gm	kcal
Casein, 30 Mesh	200	800
L-Cystine	3	12
Corn Starch	0	0
Maltodextrin 10	125	500
Sucrose	68.8	275.2
Cellulose, BW200	50	0
Soybean Oil	25	225
Lard*	245	2205
Mineral Mix S10026	10	0
DiCalcium Phosphate	13	0
Calcium Carbonate	5.5	0
Potassium Citrate, 1 H2O	16.5	0
Vitamin Mix V10001	10	40
Choline Bitartrate	2	0
FD&C Blue Dye #1	0.05	0
Total	773.85	4057

Formulated by E. A. Ulman, Ph.D., Research Diets, Inc., 8/26/98 and 3/11/99.

*Typical analysis of cholesterol in lard = 0.72 mg/gram.

Cholesterol (mg)/4057 kcal = 216.4

Cholesterol (mg)/kg = 279.6



Where NutriPhenomics Begins



© 2006 Research Diets, Inc. All rights reserved. D12492-2-13

9.2 Peso corporal de la descendencia femenina día post-natal (PND) 1 al 60.

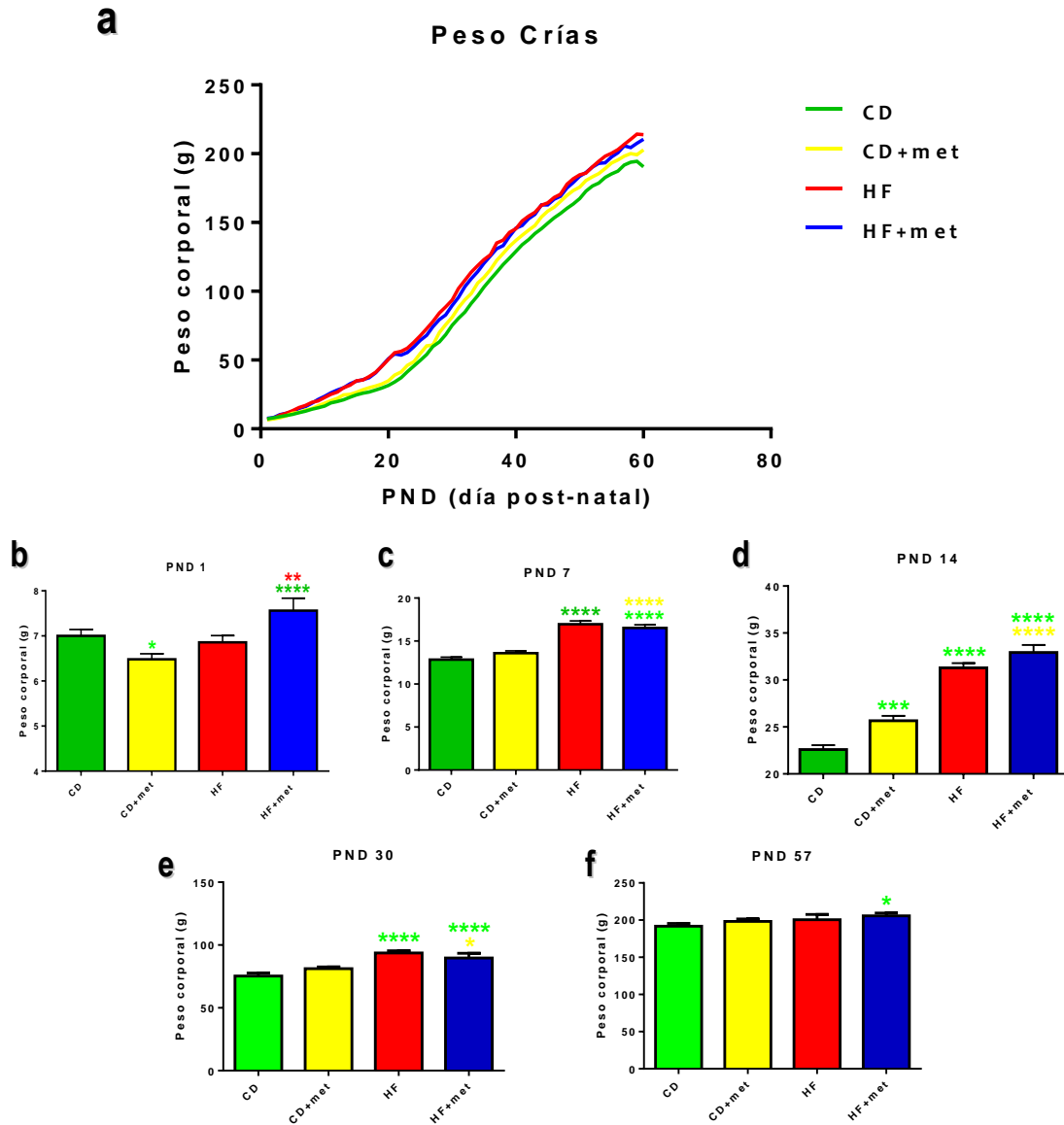


Figura 11. Peso corporal PND 1 - 60. (a) El gráfico representa el peso corporal de las crías desde el PND 1 al 60. Se evaluó las diferencias de peso en los PND 1, 7, 14, 30 y 5 representadas en los gráficos b, c, d, e y f, respectivamente. Los datos representados en el gráfico muestran el promedio \pm E.E.M. Los diferentes grupos experimentales están representados con colores, siendo la barra de color verde el grupo CD, en amarillo el grupo CD+met, rojo HF y en azul HF+met. El valor de p sobre las barras indica su comparación con los diferentes grupos representado con * del color correspondiente. La significancia se obtuvo mediante el test de ANOVA con post test de Fisher; $p < 0,05 = *$; $p < 0,01 = **$; $p < 0,001 = ***$; $p < 0,00001 = ****$.

9.3 Peso del tejido adiposo blanco retroperitoneal (RpAT)

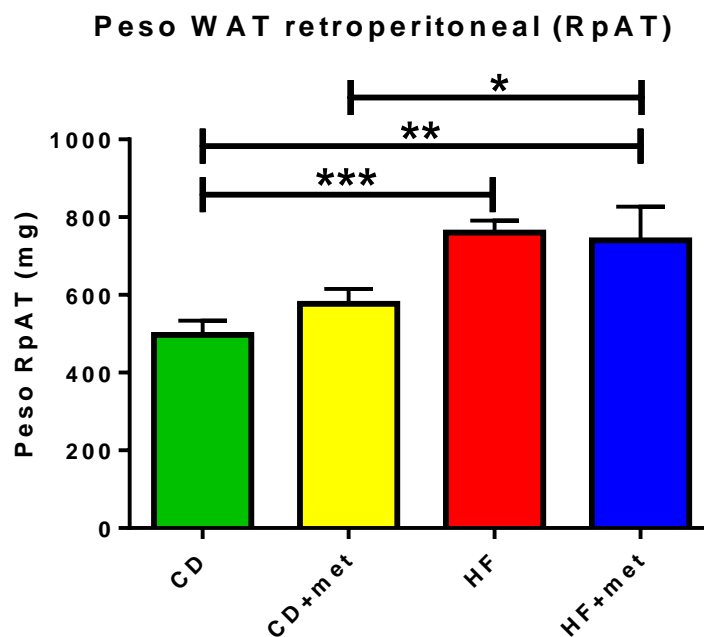


Figura 12. Peso del tejido adiposo retroperitoneal en mg. El gráfico representa el peso del RpAT en la descendencia femenina adulta. Los datos representados en el gráfico muestran el promedio \pm E.E.M. Los diferentes grupos experimentales están representados con colores, siendo la barra de color verde el grupo CD, en amarillo el grupo CD+met, rojo HF y en azul HF+met. La significancia se obtuvo mediante el test de ANOVA con post test de Fisher; $p < 0,05 = *$; $p < 0,01 = **$; $p < 0,001 = ***$.

9.4 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 X	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 especifico 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 X	NO	NC
<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 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.</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 X	NO	
<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	NC	
		X		
<i>Especifique si su respuesta es SI.</i>				
6. Señale si los animales obtenidos deben ser sacrificados para la obtención de datos.	SI		NO	
	X			
<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.				
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)				
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.				