



FACULTAD DE FARMACIA

ESCUELA DE NUTRICION Y DIETÉTICA

**“EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON METFORMINA EN RATAS
GESTANTES OBESAS SOBRE LA PREDISPOSICIÓN AL DESARROLLO
DEL HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO DE LA DESCENDENCIA”**

**Tesis para optar al Grado Académico de Licenciado en Nutrición y Dietética y
al Título de Nutricionista**

VIVIANA TERESA VALERO JARA

Director de Tesis: Gonzalo Cruz Neculpán PhD

Co-Director de Tesis: Jonathan Martínez Pinto PhD

Valparaíso, 2017.

*Dedicado a todos los que me apoyaron,
aconsejaron y amaron incluso en el
peor de mis días.*

*Y dedicado a todos los futuros
nutricionistas que desean entrar al
área de investigación, un camino que
motiva en cada paso, incluso en sus
caídas.*

Agradecimientos

Agradezco infinitamente a mi familia por su gran apoyo, su paciencia y sus ánimos para continuar con este proceso. A Jonathan Sava por su amor incondicional, por acompañarme y motivarme en el camino de la ciencia, y por ayudarme a creer en mis capacidades. Mención honrosa a sus gatos por su fiel compañía.

También agradezco a cada integrante del Laboratorio de Alteraciones Reproductivas y metabólicas por su guía desde el primer momento en que entré. No olvidaré su compañía, su gran ayuda y cariño entregados.

Agradecer también a los Profesores Daniela Fernandois y Gonzalo Jorquera por su enorme voluntad, guía y paciencia. Admiro profundamente sus maneras tan pedagógicas de despejar mis dudas.

Por último, un agradecimiento enorme a los profesores Gonzalo Cruz y Jonathan Martínez, quienes son mi ejemplo a seguir como docentes y científicos. Gracias a ambos por su disposición, por respetar mis procesos de aprendizaje, por su tiempo y sus consejos.

Gracias a todos los que participaron de este largo camino, y gracias papá por estar conmigo desde el otro mundo.

Viviana Valero.

Resumen

Los porcentajes de sobrepeso y obesidad afectan tanto a hombres como mujeres en Chile. Sumado a esto, ha aumentado la sospecha de Diabetes Mellitus en la población, lo que aumenta el riesgo en las futuras gestantes. Las consecuencias de la obesidad gestacional han sido ampliamente estudiadas, con un elevado riesgo en la descendencia de desarrollar patologías como intolerancia a la glucosa, hipertensión arterial, obesidad, entre otras. Estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que la descendencia femenina de ratas con obesidad inducida por una dieta alta en grasa, presentan alteraciones metabólicas que conllevan a la Enfermedad del Hígado Graso no Alcohólico (NAFLD), así también se ha dilucidado en este mismo modelo que Metformina tiene efectos sobre el Sistema Nervioso Simpático en ovario. En base a esto se plantea que la administración del fármaco en ratas gestantes obesas previene el desarrollo de Hígado Graso No Alcohólico en la descendencia, a través de una disminución de la actividad simpática en hígado y la modulación de las enzimas relacionadas con el metabolismo de lípidos y carbohidratos. Se utilizó la descendencia de ratas de la cepa Sprague-Dawley sometidas a dieta control o alta en grasa, con o sin tratamiento de Metformina. Analizamos el peso corporal, el peso hepático, el peso de grasa retroperitoneal, los niveles de glucosa, los niveles de NA, los niveles de MHPG, la razón MHPG/NA, y la expresión de las enzimas TH, PEPCK, ACC y PYGL en hígado. Si bien por dificultades experimentales las enzimas no fueron medidas, se observó que Metformina aumentó las concentraciones de NA, mientras que la razón MHPG/NA y la expresión de TH se encontraban disminuidas respecto a los grupos no

tratados. Así también, la grasa retroperitoneal disminuyó respecto a los grupos sin tratar. Esto indica un efecto potencial del fármaco sobre NAFLD, que continúa por dilucidarse.

Abstract

Effects of treatment with metformin on obese pregnant rats on the predisposition to the development of the non-alcoholic fatty liver disease of the offspring

The percentages of overweight and obesity affect men and women in Chile. Additionally, the suspicion of Diabetes Mellitus in the population has increased, which increases the risk in future pregnant women. The consequences of gestational obesity have been studied, with a high risk in the offspring of developing pathologies, for example, glucose intolerance, hypertension, obesity, etc. Studies in our laboratory demonstrate that the female offspring of rat with obesity induced with high fat diet presents metabolic alterations that result in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), has also been elucidated in this same model that Metformin has effects on the Sympathetic Nervous System in the ovary. Based on this, it is stated that the administration of the drug in obese pregnant prevents the development of non-alcoholic fatty liver in the offspring, through a decrease in the sympathetic activity in the liver and the modulation with the related enzymes in the metabolism of lipids and carbohydrates. The offspring of rats of the Sprague-Dawley strain were sometimes used a diet control or high in fat, with or without Metformin treatment. We analyzed body weight, liver weight, retroperitoneal fat weight, glucose levels, NA levels, MHPG motifs, MHPG / NA ratio, and the expression of TH, PEPCK, ACC and PYGL enzymes Liver Although the enzymes were not measured due to the experimental difficulties, metformin increased the levels of NA, while the MHPG / NA ratio and the TH expression were decreased compared to the untreated groups. Likewise, the retroperitoneal fat decreased with respect to the

untreated groups. This indicates a potential effect of the drug on NAFLD that continues to elucidate.

Índice

Agradecimientos	4
Resumen	5
Introducción	11
Objetivo General	23
Objetivos Específicos.....	23
Materiales y Métodos	24
Variables	24
Tipo de estudio.....	24
Animales	25
Dieta de los Animales	25
Diseño Experimental.....	26
Tratamiento con Metformina.....	27
Extracción de proteínas	27
Determinación de los niveles de NA y MHPG por cromatografía líquida de alta resolución acoplado a detección electroquímica (HPLC-EC).....	28
Determinación semi-cuantitativa de la expresión de la enzima tirosina hidroxilasa en hígado por Western Blot	29
Determinación de expresión de las enzimas glucógeno fosforilasa (PYGL), acetyl CoA carboxilasa (ACC) y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) a través de RT-qPCR.....	29
Análisis Estadístico	31
Resultados	32
Peso corporal.....	32
Peso de Grasa Retroperitoneal (RpAT)	33
Peso Hepático.....	34
Niveles de Noradrenalina en Hígado.....	36
Niveles de MHPG en Hígado.....	37
Razón MHPG/NA en Hígado.....	38
Expresión de TH en hígado	39
Expresión de PYGL (Glucógeno Fosforilasa) en hígado.....	40
Discusión	43
Conclusiones	53

Bibliografía	54
Anexos.....	65
Anexo 1.....	65
Incremento de Peso de Crías según PND.	65

Introducción

El sobrepeso y la obesidad son producto de la acumulación de grasa de manera anormal o excesiva en el organismo. La causa principal de estas alteraciones es un desequilibrio energético, donde las calorías consumidas son superiores a las requeridas. Otro factor importante es el sedentarismo, que es la disminución de la actividad física. Entre los años 1980 y 2014, la prevalencia mundial de obesidad ha aumentado más del doble, siendo el 13% de la población adulta en el mundo obesos durante el 2014 (11% hombres y 15% mujeres) y el 39% con sobrepeso durante el mismo año (38% hombres y 40% mujeres) [1]. La situación en Chile es alarmante: La Encuesta Nacional de Salud 2009 – 2010 indica que el 66,3% de la población general entre 15 y 64 años presenta malnutrición por exceso, de los cuales 39% corresponde a sobrepeso, un 25% a obesidad y un 2,3% a obesidad mórbida. Del porcentaje correspondiente a la población general, un 64,3% pertenece a mujeres con exceso de peso. Siendo más específicos aún, el 51% de las mujeres en edad fértil (entre 15 y 44 años de edad) poseen exceso de peso [2]. En base a lo anterior, la posibilidad de que existan mujeres embarazadas que presenten sobrepeso u obesidad es alta. De hecho, el número de gestantes chilenas que mantiene controles con establecimientos del Sistema Nacional de Servicios de Salud (SNSS) y que sufre un exceso de peso ha ido en aumento. Por ejemplo, en el año 2010 las embarazadas con exceso de peso representaban un 54,9% y al año 2014 han aumentado hasta un 60,9% [3].

Las gestantes que cursan con exceso de peso previo y durante el embarazo son propensas a sufrir diversas complicaciones como preeclampsia, diabetes gestacional,

hipertensión gestacional, aborto recurrente, macrosomía, mortalidad materna y fetal [4]. Dichas complicaciones en el embarazo pueden repercutir en la salud de la madre desde puerperio y también a largo plazo, aumentando el riesgo de diabetes tipo 2, y enfermedades cardiovasculares como hipertensión arterial y dislipidemias [5].

Por otro lado, la exposición temprana a un ambiente de sobrenutrición podría tener consecuencias para el desarrollo *in utero* y post-parto en la descendencia. Lo anterior forma parte de un concepto denominado “reprogramación del desarrollo”, “programación fetal” o “programming”. El *programming* consiste en modificaciones en el ambiente uterino, a nivel nutritivo y/u hormonal durante períodos críticos del desarrollo del embarazo que pueden alterar la expresión del genoma fetal. Como consecuencia se provocarían cambios permanentes tanto en la estructura como en la función del organismo durante la adultez [6] [7]. Estos cambios llevan a un aumento del riesgo de resistencia a la insulina y una biosíntesis de lípidos exagerada [8-10] con implicaciones para la inducción del Hígado Graso No Alcohólico o NAFLD (del inglés *non-alcoholic fatty liver disease*) [11] [12]

El concepto de hígado graso no alcohólico incluye alteraciones mínimas que van desde la esteatosis hepática hasta la cirrosis e insuficiencia hepática [13] [14]. A su vez se encuentra relacionada con obesidad, diabetes mellitus, e hiperlipidemias, entre otras enfermedades [15].

El mecanismo patogénico de NAFLD se asocia con la resistencia a la insulina y puede explicarse como una teoría de “doble impacto”: en el primer impacto las células adiposas disminuyen su capacidad de captar insulina y por ende existe una hiperinsulinemia compensatoria. En este contexto se favorecen vías catabólicas como la lipólisis en el tejido

adiposo, donde la Lipasa Sensible a Hormonas (LSH) desdobla los triglicéridos en Ácidos Grasos Libres (AGL) y Glicerol. A esto se suma una disminución de la absorción de glucosa en músculo esquelético, un aumento de gluconeogénesis en hepatocitos, una disminución de la glucogenogénesis y un aumento de la captación de AGL. Luego, en el segundo impacto los hepatocitos intentan compensar a través de la β -Oxidación el gran flujo de AGL. En condiciones normales se forman radicales libres de oxígeno que son eliminados por vías antioxidantes, pero debido al exceso de Ácidos Grasos Libres se genera un estrés oxidativo. Esto genera lesión celular y disfunción mitocondrial. En base a esto se produce un ambiente pro-inflamatorio, a través de la liberación de componentes como *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α), *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- β), interleuquinas-8 (IL-8) e interleuquinas-6 (IL-6), las cuales han demostrado reducir la expresión de CYP3A y otros citocromos del hígado. Junto a los procesos lipotóxicos, se activan las vías que favorecen la fibrosis, necrosis y apoptosis en el hígado, disminuyendo progresivamente su función. Cabe destacar que una acumulación excesiva de TG en el hígado, provoca la alteración del transporte de triglicéridos como las *Very Low-Density Lipoprotein* (VLDL), que inhibiría la β - oxidación de ácidos grasos [16] [17].

También existe otra teoría que explicaría los mecanismos patogénicos de NAFLD: La teoría de múltiples impactos. A diferencia de la teoría anterior, explica NAFLD no sólo iniciaría con la resistencia a la insulina, si no que a base de factores múltiples e incluso paralelos como el sedentarismo, la composición de la dieta, la alteración de la microbiota intestinal, los procesos inflamatorios derivados de la obesidad e incluso la predisposición genética [18].

La relación entre la obesidad materna y el desarrollo del hígado graso no alcohólico en la descendencia ha sido sugerida por varios estudios, siendo la causa principal una alteración metabólica durante el embarazo. En la descendencia de ratas obesas se ha observado un aumento de marcadores de lesión hepática en conjunto a un aumento del tono del Sistema Nervioso Simpático (SNS), con múltiples consecuencias en hígado [11] [19]. También se ha visto un aumento en los triglicéridos hepáticos, esteatosis y un mayor peso hepático en la adultez [20].

La inervación simpática en hígado ocurre a través del nervio esplácnico y de sus fibras postganglionares, originadas en el ganglio celiaco [21] [22] que finaliza en neuronas simpáticas las cuales son uno de los principales sitios de acción de producción de catecolaminas: dopamina, adrenalina y noradrenalina (NA), que derivan de la dihidroxifenilalanina (DOPA) [23]. El aminoácido tirosina se metaboliza a DOPA por medio de la enzima tirosina hidroxilasa (TH), la cual es la enzima limitante de la síntesis de catecolaminas. El producto posterior a DOPA, catalizada por la enzima dopa-decarboxilasa, es dopamina, y esta es capturada por vesículas de almacenamiento. Por último, y por la acción de la enzima dopamina β -hidroxilasa se obtiene NA que será liberada al espacio sináptico en respuesta a un estímulo nervioso [24]. Luego de ser captada por la neurona, la noradrenalina es inactivada por almacenamiento o desaminada oxidativamente por la enzima monoaminoxidasa (MAO) a 3,4-dihidroxifenilglicol (DHPG) antes de ser reducida y O-metilada por la enzima Catecol-O-metiltransferasa (COMT) a 3-metoxi-4-hidroxi-fenilglicol (MHPG). Noradrenalina puede ser catabolizada

por COMT directamente, formando Normetanefrina (NMN) para posteriormente, formar MHPG a través de la enzima MAO [23] (Figura 1).

En hepatocitos predominan receptores de membrana del tipo β -adrenérgicos [25]. Se sabe que noradrenalina ejerce su efecto a través de receptores β -2-adrenérgicos que genera una acumulación de AMPc conduciendo a la activación de la proteína quinasa dependiente de AMPc. A su vez se fosforilan muchas enzimas implicadas en la glucogenólisis y gluconeogénesis [26].

También alteran el metabolismo del glucógeno hepático (glucogenólisis) y la gluconeogénesis a través de los receptores α -adrenérgicos [27] (Figura 2).

En cuanto al metabolismo de lípidos, las catecolaminas tienen un efecto sobre la lipólisis en tejido graso. Al unirse a receptores α -adrenérgicos, complejo que se une a proteína G, se inhibe adenilato ciclasa y con ello las concentraciones de AMPc. Con ello la LSH no se fosforila y la lipólisis no se lleva a cabo. La unión a receptores β -adrenérgicos, en cambio, provocan la fosforilación de LSH, produciéndose la lipólisis [28].

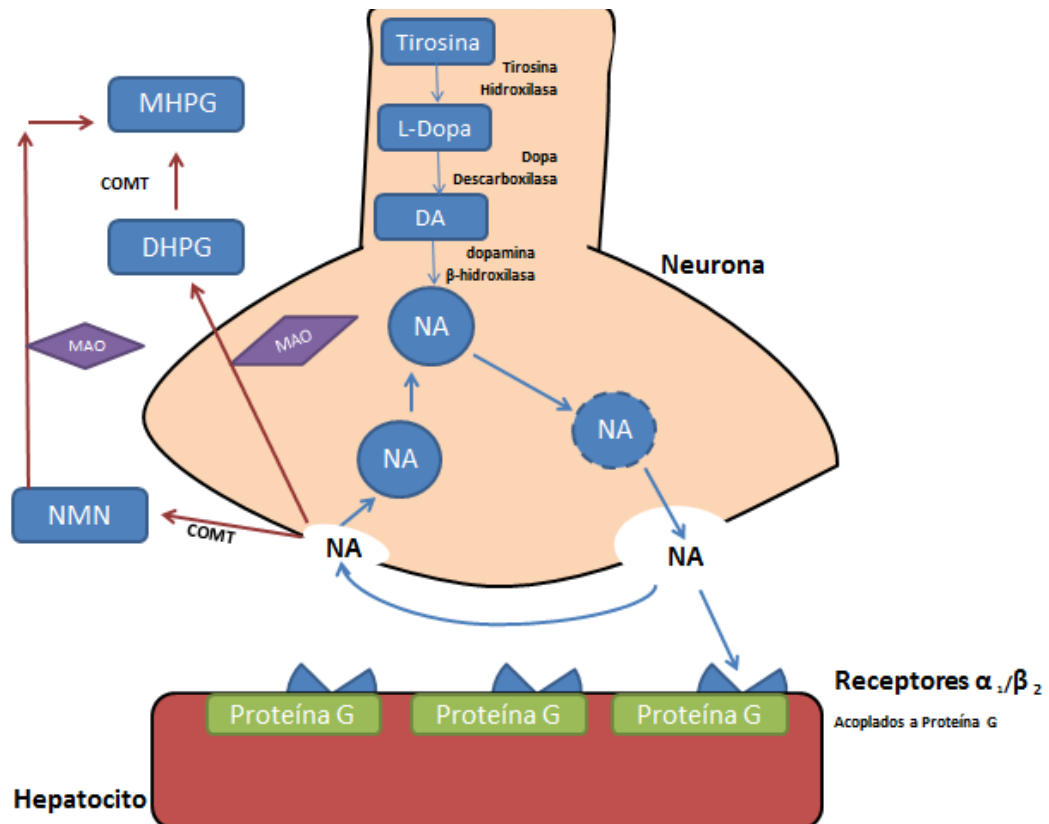


Figura 1: Biosíntesis, liberación y metabolismo de Noradrenalina. NA: Noradrenalina, DA: Dopamina, MAO: Enzima Monooxidasa, NMN: Normetanefrina, COMT: enzima Catecol-O-metiltransferasa, DHPG: 3,4-dihidroxifenilglicol, MHPG: 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol. Flechas Azules: Biosíntesis, Almacenamiento, Liberación, Unión a Receptor y Recaptación. Flechas Rojas: Metabolismo de NA. Fuente: Elaboración Propia.

En un estudio previo en nuestro laboratorio [19] se escogieron enzimas relacionadas, pero fundamentales para el metabolismo de carbohidratos y lípidos, y la patogénesis de NAFLD: Glucógeno Fosforilasa (PYGL) y Acetil-Coa Carboxilasa (ACC). La primera enzima se encarga de la degradación del glucógeno hepático, escindiendo puentes α-1,4 glicosídicos

para liberar glucosa-1-fosfato (G1P) que puede entrar a la vía de pentosa fosfato por medio de la conversión a glucosa-6 Fosfato (G6P) [29].

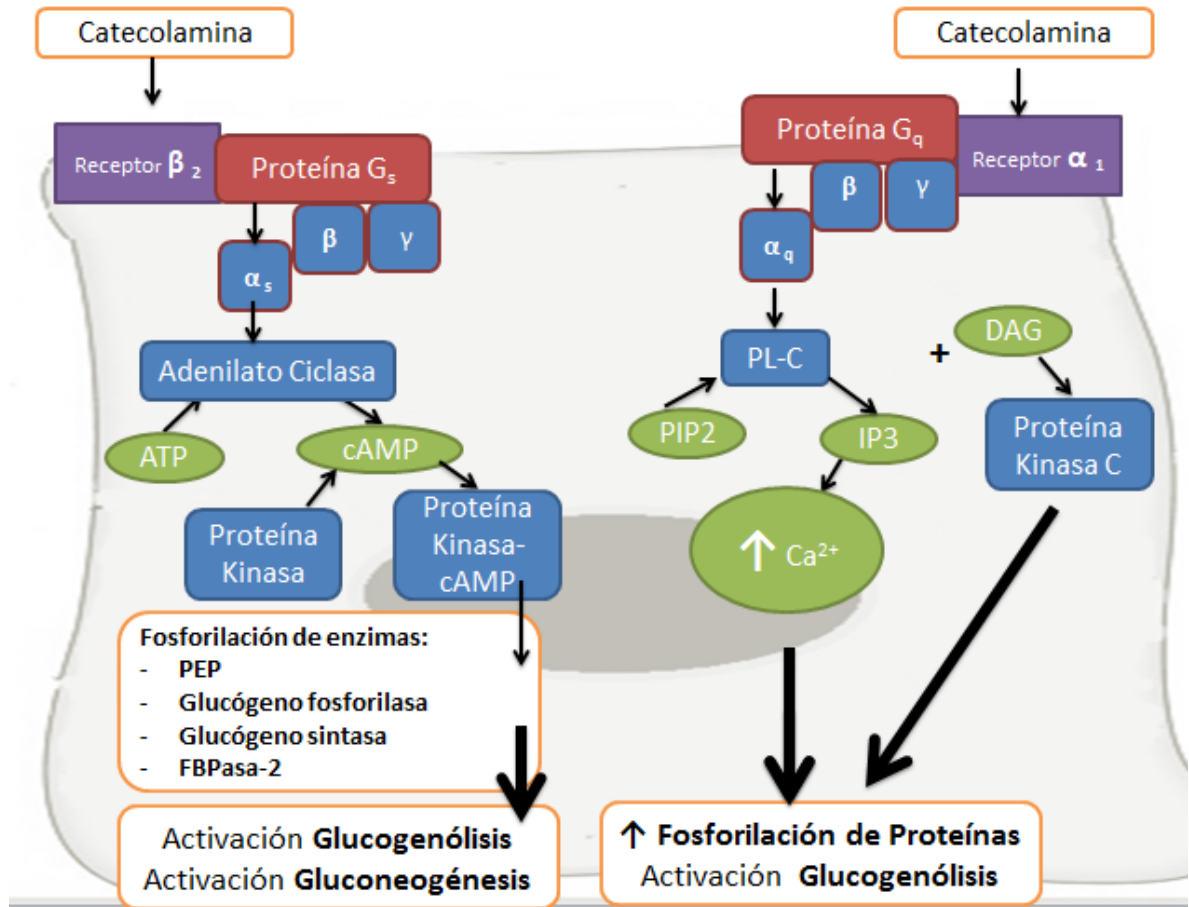


Figura 2: Tipos de receptores adrenérgicos en Hepatocito. El receptor adrenérgico β -2 está acoplado a Proteína G_s y posee una cascada desde Adenilato Ciclasa. El receptor adrenérgico α -1 acoplado a proteína G_q y activa a Fosfolipasa C (PL-C), aumentando la concentración de Calcio citoplasmático y la activación de Proteína Kinasa C. Ambos receptores activan vías gluconeogénicas. PIP2 (fosfatidilinositol bifosfato), IP3 (inositol trifosfato), DAG (diacilglicerol). Fuente: Elaboración Propia.

Estas enzimas aumentan su expresión en hijas de madres alimentadas con dieta alta en grasa. La causa sería la acumulación de lípidos en hígado que exacerbaría el número de sustrato glucosa 6-fosfato. La unión de noradrenalina al receptor α -adrenérgico en hígado aumenta la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplasmático, que activa la enzima PYGL [29].

Una investigación realizada en ratas descendientes de madres obesas, ambos alimentados con dieta alta en grasa, se ha descrito una oxidación disminuida de lípidos a través de una baja fosforilación realizada por ACC. Esta enzima, al producir malonil-CoA, inhibe la oxidación de ácidos grasos. A su vez, sugiere que la transferencia materna de lípidos durante la gestación estaría asociada con cambios metabólicos a nivel fetal, reduciendo el transporte de TG y disminuyendo la oxidación lipídica, con lo anterior aumenta el riesgo de NAFLD [30][31]

Cabe destacar, que en la gluconeogénesis existen tres enzimas que constituyen etapas limitantes y reguladoras del proceso: la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), la fructosa 1,6 bisfosfatasa (FBPasa) y la Glucosa-6-Fosfatasa (G6Pasa). PEPCK cataliza la conversión de oxaloacetato en fosfoenolpiruvato, la fructosa-1,6-bifosfatasa desde fructosa-1,6-bifosfato a fructosa-6-fosfato, y la G6Pasa cataliza el paso final de la gluconeogénesis, la producción de glucosa libre desde Glucosa-6-fosfato [32] (Figura 3).

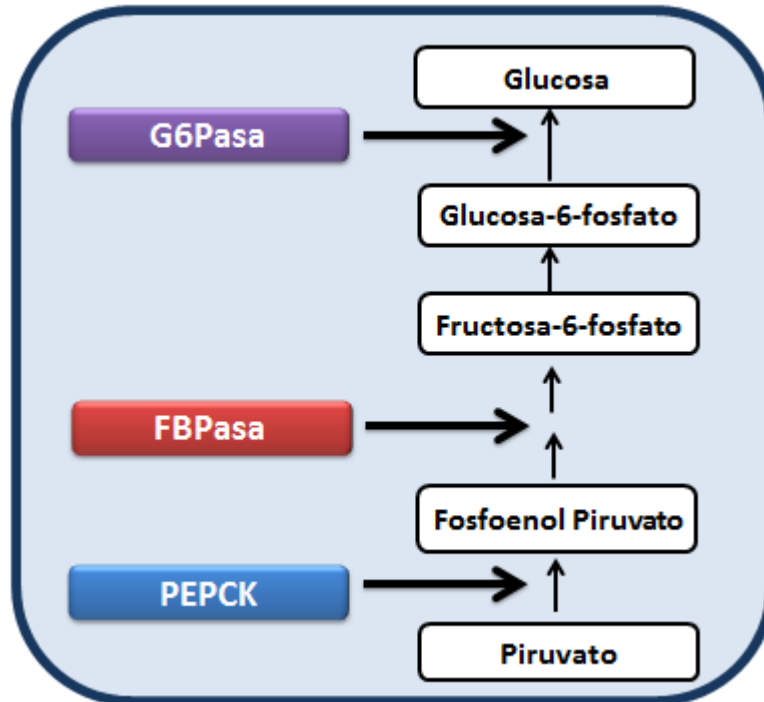


Figura 3: Enzimas limitantes en el proceso de gluconeogénesis. La enzima PEPCK sería la de interés a investigar en este trabajo. PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, FBPasa: fructosa 1,6 bisfosfatasa, G6Pasa: Glucosa-6-Fosfatasa Fuente: Elaboración Propia.

En el estudio antes mencionado [30] se observó que la enzima PEPCK aumentó en un 35% en el grupo con dieta alta en grasa en comparación con el grupo control.

Algunos estudios indican que metformina puede disminuir la gluconeogénesis a nivel hepático, y la producción de triacilglicerol en niños y adultos con NAFLD [33, 34]. Este normoglicemiante oral ha sido también el más estudiado como parte del tratamiento de la diabetes gestacional, demostrando seguridad y efectividad durante el segundo y tercer trimestre de embarazo [35]. El fármaco disminuye la producción de glucosa hepática y la

absorción intestinal de glucosa, aumentando la captación periférica de glucosa y su utilización. Metformina actúa sobre la mitocondria, estimulando la beta-oxidación y la actividad piruvato kinasa, produciendo una disminución de las enzimas lipogénicas. Sus principales efectos son la reducción de la síntesis hepática de glucosa, el aumento de la captación de insulina en el musculo esquelético y en los adipocitos, con una consecuente disminución de la oxidación de AGL. Esto se asociaría con el mejoramiento alteraciones metabólicas como la esteatosis hepática [36].

La diabetes gestacional altera diversos sistemas en el feto; el pobre control glicémico desde el inicio del embarazo afecta la organogénesis y el control tardío de la composición corporal, incluyendo macrosomía y dificultad [37]. Está comprobado en diversos estudios que dietas altas en grasa previo y durante la gestación tiene como una de sus consecuencias una resistencia a la insulina, el cual es parte importante de la patogénesis de NAFLD en la teoría de “doble impacto” [37-39]. Además en un estudio realizado en nuestro laboratorio se observó que la descendencia femenina de madres obesas presenta esteatosis representada por la presencia de vesículas lipídicas en los hepatocitos [40].

Resultados previos en nuestro laboratorio muestran que la concentración de MHPG en ovario disminuye con el uso de metformina en la descendencia femenina de ratas madres obesas (alimentadas con dieta HF), respecto al grupo control. Del mismo modo el grupo HF+MET (Dieta High Fat + Metformina) también experimentó esta disminución respecto al grupo control HF. Para estos grupos la razón MHPG/NA también tiene los mismos resultados [41]. Lo anterior podría sugerir que existe una disminución en la degradación de NA.

Existe la posibilidad de que, entonces, los efectos de metformina sobre la resistencia a la insulina, la glicemia, el metabolismo de carbohidratos y lípidos, entre otros... pudieran prevenir o disminuir el desarrollo del hígado graso no alcohólico en la descendencia femenina de madres con dieta alta en grasa.

Hipótesis

La administración de metformina en ratas gestantes obesas previene el desarrollo de Hígado Graso No Alcohólico (NAFLD) en la descendencia a través de una disminución de la actividad simpática en hígado.

Objetivo General

Evaluar el efecto de la metformina administrada durante la gestación sobre el control simpático en el desarrollo de hígado graso no alcohólico, en la expresión de enzimas hepáticas relacionadas con el metabolismo de lípidos y carbohidratos en ratas adultas descendientes de madres con obesidad inducida por la dieta y tratadas con metformina.

Objetivos Específicos

- Determinar la concentración de noradrenalina (NA) y 3-metoxi- 4-hidroxi-fenilglicol (MHPG) en el hígado de ratas adultas descendientes de madres alimentadas con una dieta alta en grasa o dieta control y tratadas con metformina.
- Cuantificar la expresión de la enzima Tirosina Hidroxilasa (TH) en el hígado de ratas adultas descendientes de madres alimentadas con una dieta alta en grasa o dieta control y tratadas con metformina.
- Determinar la expresión de las enzimas glucógeno fosforilasa (PYGL), acetil CoA carboxilasa (ACC) y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) en el hígado de ratas adultas descendientes de madres alimentadas con una dieta alta en grasa o dieta control, tratadas con metformina.
- Cuantificar el peso corporal, peso de grasa retroperitoneal (RpAT) y peso hepático en de ratas adultas descendientes de madres alimentadas con una dieta alta en grasa o dieta control, tratadas con metformina.
- Determinar la glicemia de ratas adultas descendientes de madres alimentadas con una dieta alta en grasa o dieta control, tratadas con metformina.

Materiales y Métodos

Variables

Independientes	Dependientes
Dieta Control	Noradrenalina (NA) (ng/mg hígado)
Dieta Control + Met	3-metoxi- 4-hidroxi-fenilglicol (MHPG) (pg/mg de hígado)
Dieta HF	Tirosina hidroxilasa (TH) en hígado (U.R. a GAPDH*)
Dieta HF + Met	Niveles de ARNm de enzimas hepáticas PYGL, ACC, PEPCK (U.R. a GAPDH*)

Todas las variables dependientes a estudiar son cuantitativas continuas. *Los valores obtenidos en Westernblot y qPCR serán representados en unidades relativas (U.R.) con respecto al gen constitutivo GAPDH (Técnica semicuantitativa).

Tipo de estudio

Estudio analítico experimental longitudinal prospectivo.

Animales

Se utilizó hígados congelados a temperatura -80°C procedentes de una serie experimental del Proyecto FONDECYT 11130707, cuyo investigador responsable es el Profesor Gonzalo Cruz Neculpán. La serie corresponde a la descendencia femenina de 20 ratas hembras de la cepa Sprague Dawley, cuyo diseño experimental se explicará más adelante. Las ratas madres del estudio poseían un peso de 150 a 200g al inicio del estudio, las cuales posteriormente se conservaron en la sala de mantención de animales del Instituto de Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso durante todo el protocolo, en un ambiente con temperatura controlada ($20-22^{\circ}\text{C}$), con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas, y con alimento y agua *ad libitum*.

Dieta de los Animales

Las ratas madres fueron alimentadas con una dieta control (Lab diet, 23% Proteína, 64% Hidratos de Carbono, 13% Lípidos; equivalentes a 4 Kcal/g), o una dieta alta en grasas (High Fat: HF, Research DietTM USA; 20% Proteína, 20% Hidratos de Carbono y 60% Lípidos; equivalentes a 5 Kcal/g). Cabe destacar que todas las ratas hembras descendientes fueron alimentadas con la dieta control mencionada anteriormente, desde el destete (día 21 de vida; PND21) hasta el momento de la eutanasia.

Diseño Experimental

Las 3 primeras semanas, posterior a la llegada de los animales a la sala de mantención, todos los animales fueron habituados a las condiciones experimentales con dieta control. Se registró diariamente el peso corporal, la ingesta de alimentos y el ciclo estral en que se encontraban, a través de frotis vaginal. A la tercera semana las ratas fueron divididas aleatoriamente, según su dieta, en dos grupos (n=10): Dieta Control (CD) / Dieta Alta en Grasas (HF); la cual se mantuvo hasta el periodo de destete que corresponde el día postnatal (PND) 21. Para el grupo de ratas tratadas con metformina la administración del fármaco se realizó a las madres una semana antes de la cruce y hasta el PND 14 de las crías. Luego de 4 semanas de ocurrida la separación entre los grupos, independiente de la dieta, todas las ratas fueron cruzadas con machos reproductores alimentados con CD. Mediante la observación del frotis vaginal se realizó confirmación de preñez en estos casos: al encontrarse espermatozoides en dicho frotis o que el animal haya pasado 2 ciclos estrales sin pasar por fase estro (sin ovulación), es decir, con ocho diestros consecutivos. Las crías fueron sexadas al PND1 mediante observación genital. Posterior al periodo de destete (PND 21), las crías fueron separadas de sus madres y se les alimentó con CD. Las crías se eutanasiaron al PND 60 durante la etapa estro del ciclo estral, mediante decapitación. Al momento de la eutanasia se recolectó sangre para la extracción de suero, se midió glicemia y se recolectaron distintos órganos, entre ellos, una sección del lóbulo mayor del hígado por cada rata. Los procedimientos de eutanasia de los animales de experimentación fueron realizados por personal capacitado en bioética y manejo de animales. Todos los

procedimientos experimentales han sido aprobados por el Comité Institucional de Bioética para el Cuidado de Animales de la Universidad de Valparaíso (CIBICA-UV).

Tratamiento con Metformina

Para el grupo de ratas madres tratadas con metformina (met), una semana antes de iniciar el periodo de cruce se re-agruparon en los siguientes 4 subgrupos (n=5): CD, CD+Met, HF y HF+Met. Las madres estuvieron en tratamiento hasta el día 14 de lactancia ya que desde ese momento las crías comienzan a alimentarse por su cuenta y podrían consumir la metformina también. La administración de metformina se hizo a través de un vehículo de gelatina, con una dosis terapéutica en ratas de metformina clorhidrato de 250 mg/Kg peso/día (metformina 100g, preparado magistral Ecovital). El grupo control sin metformina consumió un vehículo de jalea sin el fármaco.

Extracción de proteínas

Para homogenizar los tejidos se utilizó un buffer de lisis RIPA (50 mM de Tris HCl pH 8, 150 mM de NaCl, 1% de NP-40, 0,1% de SDS, 2 mM de EDTA pH 7,4 y 1,5 mM de PMSF) con adición de un inhibidor de proteasas comercial (Protease Inhibitor Cocktail, Promega, Cat: G6521). Se homogenizó entre 40 a 50 mg de tejido en un homogeneizador vidrio-vidrio de 1mL y se agregó 10 veces el volumen de buffer de lisis. Se colocó en una centrífuga Marca Thermo Scientific a velocidad máxima (13,000 – 15,000 rpm por 5 minutos), para posteriormente recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo. De allí se sacó

10 μL , diluyéndose con 990 μL de agua destilada, quedando en una proporción de 1:100.

Tanto el homogenizado como las muestras se guardaron a -20°C hasta que se analicen.

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

Parte de la muestra del hígado se homogenizó en base a una solución de 200 μL de ácido perclórico 0,2 N y se centrifugó durante 15 min a 4°C , con una velocidad 12,000 rpm. El sobrenadante fue separado y almacenado a -80°C . Posteriormente se filtró por un poro de 0,22 μm (13 mm Luer Syringe Filter), y se inyectó 20 μL de este filtrado en el sistema de HPLC plus Jasco PU-2089s acoplado a un detector electroquímico EICOM ECD-700S y al digitalizador Jasco LC-NetII / ADC, con una columna Kromasil 100-3,5-C18 (AkzoNobel). La fase móvil, compuesta de 0,1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,14M Octil sulfato, 0,02% EDTA y 1,5 % Acetonitrilo a pH 2,6, se bombeó con un flujo de 1 mL/min. Luego, las áreas de los picos de NA de estas muestras se compararon con estándares de referencia, pudiéndose calcular también las concentraciones de NA usando una curva de calibrado. Para la construcción de los cromatogramas se utilizó el software JASCO ChromPass Chromatography Data System v1.7.403.1. Por último, obteniendo la cantidad de NA y MHPG, se normalizó por peso de cada una de las muestras.

Determinación semi-cuantitativa de la expresión de la enzima tirosina hidroxilasa en hígado por Western Blot

Primero se homogenizó 20mg del tejido en un buffer RIPA, correspondiente 10 veces el peso del tejido, en un volumen de 200µL. Estas muestras luego fueron centrifugadas para obtener una fracción purificada de sus proteínas. Posteriormente se realizó electroforesis en un gel SDS-PAGE (SDS-poliacrilamida al 10%), para luego, ser transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Para bloquear los sitios inespecíficos se utilizó leche descremada al 5% diluida en TBS-T. Para la identificación de la enzima tirosina hidroxilasa se utilizó como anticuerpo primario Rabbit pAb Anti-tyrosine hydroxylase (Cat. 657012 SIGMA-ALDRICH), y como anticuerpo secundario Anti-Rabbit IgG (Cat. 7074S Cell Signaling) conjugado con peroxidasa de rábano (HRP). Los resultados normalizaron en base a un anticuerpo para la proteína constitutiva GAPDH (Cat. G9545 SIGMA-ALDRICH).

Determinación de expresión de las enzimas glucógeno fosforilasa (PYGL), acetil CoA carboxilasa (ACC) y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) a través de RT-qPCR

Para la extracción de RNA total en hígado se utilizó E.Z.N.A.® Total RNA Kit I (OMEGA BIO-TEK, Cat. R6834-02CH). La transcripción reversa se realizó con la enzima SuperScript II (Invitrogen, Cat. 18064-014), random primers (Invitrogen, Cat. 48190-011) e inhibidor de RNAasa (RNase OUT, Invitrogen, Cat. 10777-019).

En la Tabla 1 se muestran los partidores utilizados para la amplificación del cDNA obtenido de la transcripción reversa, a través del PCR en tiempo real (qPCR), cuyos datos fueron normalizados por el gen constitutivo GAPDH.

Tabla 1. Partidores de enzimas PYGL, ACC, PEPCK-1 y gen constitutivo GAPDH. [19] [42]

Gen	Partidor Foward	Partidor Reverse
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	5' – GAT GCC CCC ATG TTT GGAT – 3'	5'- CGT CAT GAG CCC TTC CAC AAT - 3'
Glycogen phosphorylase, liver form (Pygl)	5' –CCC GAG CAC CCA ATG ACT TTA ACC-3'	5'-GCG AGT GCG GGA TGT GTG TCA-3'
Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (Pepck-1)	5'-GAC CCT GAT TGC TCA CCT CC – 3'	5'- AAG GCT GCT GCC AGG TAT TT -3'
Acetyl-Coenzyme A carboxylase (Liver) (Acc)	5' – AAC ATC CCG CAC CTT CTT CTA C-3'	5'- CTT CCA CAA ACC AGC GTC TC-3'

En la tabla 2 se resumen las condiciones de tiempo y temperatura utilizadas en cada ciclo de amplificación para cada gen utilizado:

Tabla 2. Condiciones de tiempo y temperatura utilizados en PCR en tiempo real. [19] [41]

Gen	Desnaturalización	Alineación	Elongación
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	95°C x 10 seg.	60°C x 20 seg.	72°C x 30 seg.
Glycogen phosphorylase, liver form (Pygl)	95°C x 10 seg.	65°C x 15 seg.	72°C x 20 seg.
Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (Pepck-1)	95°C x 10 seg.	55°C x 15 seg	72°C x 20 seg.
Acetyl-Coenzyme A carboxylase (Liver) (Acc)	95°C x 10 seg.	61°C x 15 seg.	72°C x 20 seg.

Análisis Estadístico

Para el análisis de datos se utilizó GraphPad Prism®, versión 6.01. Los resultados fueron expresados en términos del promedio \pm el error estándar medio (SEM), con un nivel de significancia de $p < 0,05$ y un nivel de confianza entre 1,05 y 0,099, para indicar diferencias estadísticamente significativas. A través del test D'Agostino – Pearson, se determinó si era posible asumir que los datos obtenidos tienen una distribución normal. Para los resultados normales se utilizó la prueba One – Way ANOVA con Post Test de Fisher's LSD, de no resultar normales se utilizó la prueba One – Way ANOVA con Post Test de Kruskal – Wallis. Ambos post-test se realizaron con el objeto de evaluar diferencias significativas entre las medias experimentales.

Resultados

Peso corporal

En la figura 4 se aprecia el peso corporal en gramos (g) de las ratas descendientes de madres alimentadas con dieta HF y dieta control, con o sin tratamiento con metformina, a los 60 días de edad (PND 60). Se observa que en el grupo HF existe una tendencia a un peso corporal mayor que las ratas control ($P=0,0970$). Las crías de madres con tratamiento con metformina, independiente de la dieta materna, no presentan diferencias significativas de peso ($P<0.005$) al PND60 con respecto a los grupos sin tratamiento.

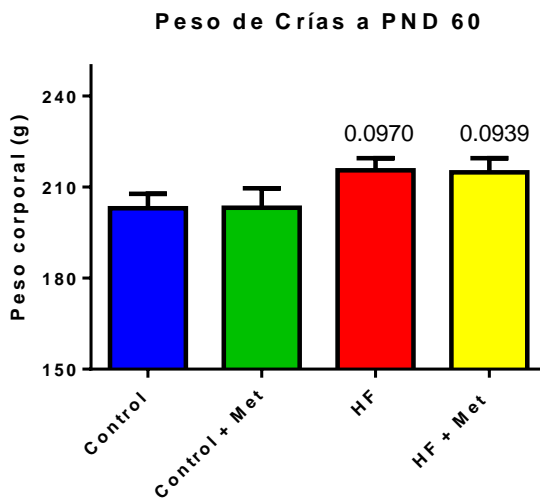


Figura 4: Peso corporal de crías al PND 60. El gráfico representa el peso de las crías en gramos (g) al día postnatal 60 de los grupos Control (n = 9), Control + Met (n=10), HF (n=9) y HF + Met (n=8). Los resultados se expresan como el promedio \pm EEM. La significancia se obtuvo mediante el test de ANOVA con post test de Fisher. $P = 0,0970$ y $P = 0,0939$, vs Control.

Peso de Grasa Retroperitoneal (RpAT)

En la figura 5 se aprecia el peso de la grasa retroperitoneal en miligramos (mg), de las ratas descendientes de madres alimentadas con dieta HF y dieta control, con o sin tratamiento con metformina, a los 60 días de edad (PND 60). El peso de la grasa retroperitoneal fue mayor en las crías del grupos HF en comparación con los grupos Control y Control + Met. Mientras que el peso de la grasa retroperitoneal fue mayor en el grupo HF + Met comparado con el grupo Control.

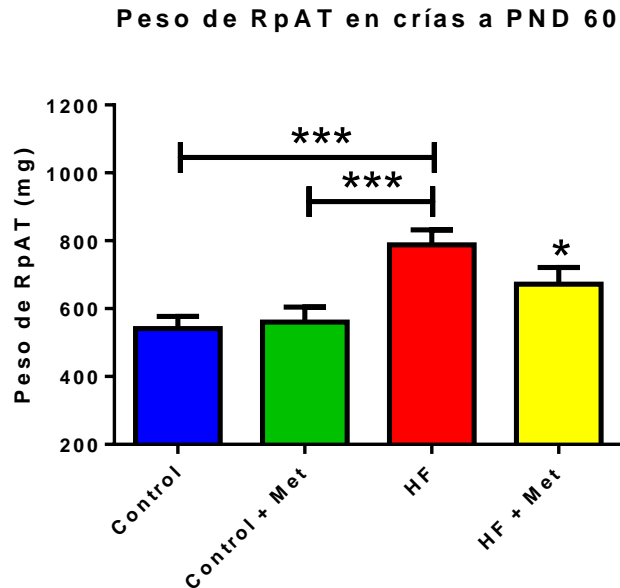


Figura 5: Peso de RpAT en crías al PND 60. El gráfico representa el peso de la grasa retroperitoneal (en miligramos) al día postnatal 60 de los grupos Control (n = 10), Control + Met (n=10), HF (n=9) y HF + Met (n=9). Los resultados se expresan como el promedio \pm EEM. . La significancia se obtuvo mediante el test de ANOVA con post test de Fisher. * = $P < 0.05$ vs Control. *** = $P < 0.001$ vs Control o Control - Met.

Peso Hepático

En la figura 6 se observa el peso hepático en gramos (g) de las ratas descendientes de madres alimentadas con dieta HF y dieta control, con o sin tratamiento con metformina, a los 60 días de edad (PND 60). Los datos no muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos.

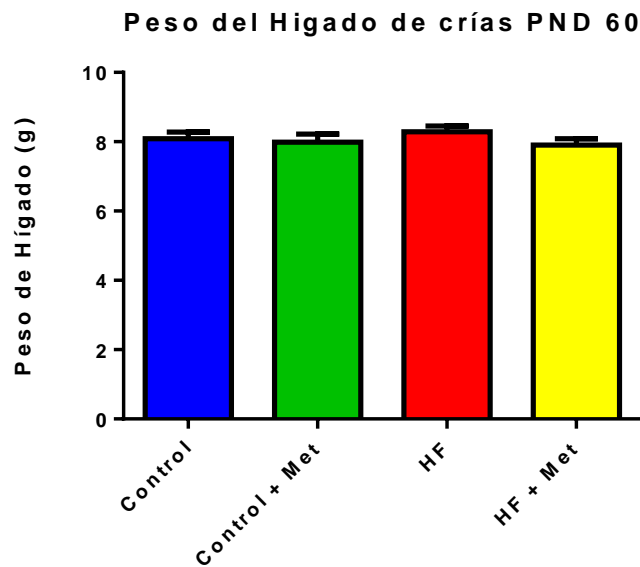


Figura 6: Peso Hepático de las crías al PND 60. El gráfico representa el peso del hígado (en gramos) al día postnatal 60 de los grupos Control (n = 10), Control + Met (n=10), HF (n=9) y HF + Met (n=9). Los resultados se expresan como el promedio \pm EEM.

Niveles de Glucosa Sérica

En la siguiente figura se grafican los niveles de glucosa sérica o glicemia en mg/dL, de ratas descendientes de madres alimentadas con dieta HF y dieta control, con o sin tratamiento con metformina, a los 60 días de edad (PND 60). Los datos no presentan diferencias significativas ($p < 0,005$) entre los grupos.

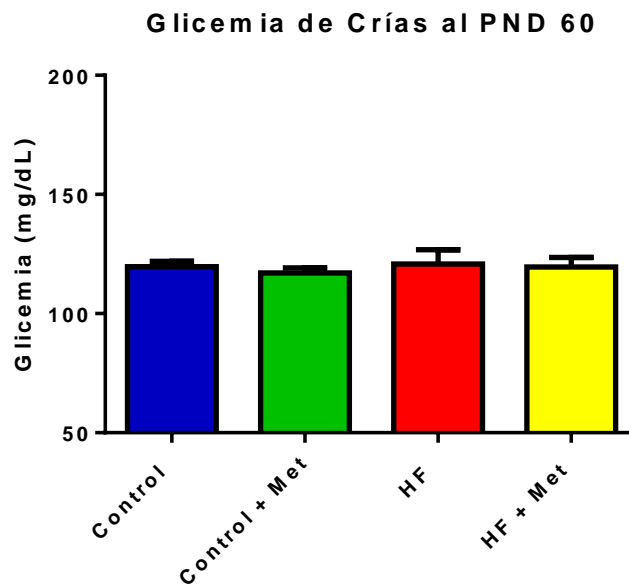


Figura 7: Glucosa Sérica o Glicemia de las crías al PND 60. El gráfico representa la glicemia al día postnatal 60 de los grupos Control ($n = 9$), Control + Met ($n=9$), HF ($n=10$) y HF + Met ($n=10$). Los resultados se expresan como el promedio \pm EEM.

Niveles de Noradrenalina en Hígado

En la figura 8 se observa la concentración de noradrenalina hepática en ratas descendientes de madres alimentadas con dieta HF y dieta control, con o sin tratamiento con metformina, a los 60 días de edad (PND 60). Los grupos tratados con metformina poseen una mayor concentración de noradrenalina en hígado en comparación al grupo Control. En el caso de las crías HF la concentración de esta catecolamina tiende al aumento con respecto al grupo Control (P = 0,0872).

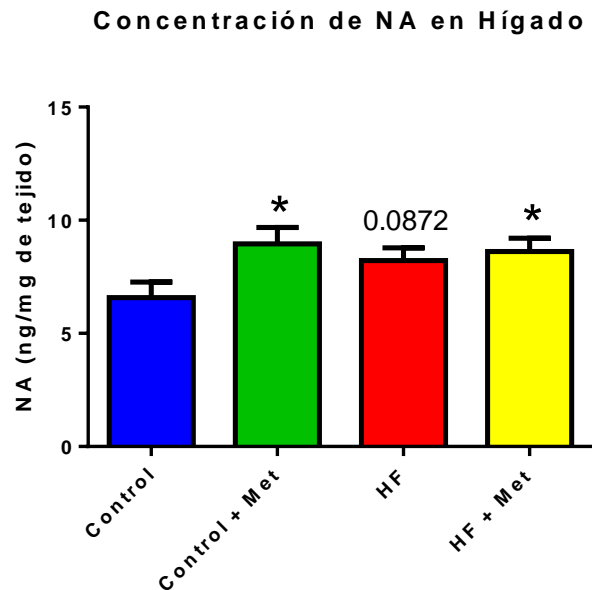


Figura 8: Concentración de noradrenalina (NA) en hígado. El gráfico representa concentración de noradrenalina (en ng/mg de tejido) al día postnatal 60 de los grupos Control (n = 10), Control + Met (n=10), HF (n=9) y HF + Met (n=10). Los resultados se expresan como el promedio \pm EEM. La significancia se obtuvo mediante el test de ANOVA con post test de Fisher. * = $P < 0.05$ vs Control. $P = 0,0872$, vs Control.

Niveles de MHPG en Hígado

Las concentraciones de MHPG hepático se aprecian en la figura 9, y corresponden a las ratas descendientes de madres alimentadas con dieta HF y dieta control, con o sin tratamiento con metformina, a los 60 días de edad (PND 60). El gráfico no presenta diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos.

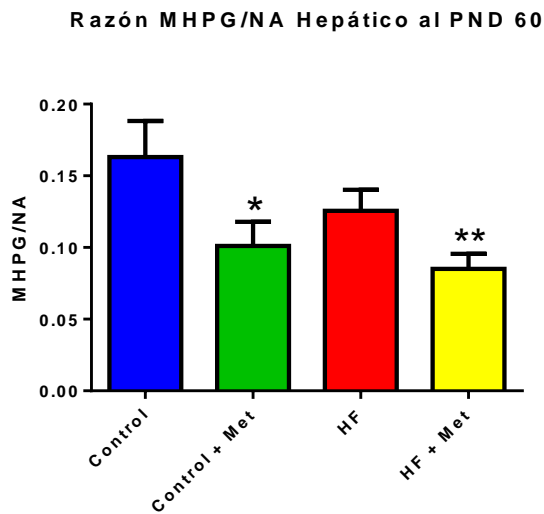


Figura 9: Concentración de 3-metoxi-4-hidroxi-fenilglicol (MHPG) en hígado al PND 60. El gráfico representa concentración de MHPG (en pg/mg de tejido) al día postnatal 60 de los grupos Control (n = 9), Control + Met (n= 9), HF (n= 9) y HF + Met (n=10). Los resultados se expresan como el promedio \pm EEM. La significancia se obtuvo mediante el test de ANOVA con post test de Fisher. * = $P < 0.05$ vs Control. ** = $P < 0.01$ vs Control.

Razón MHPG/NA en Hígado

En la figura 10 se muestra la razón MHPG/NA en hígado de ratas descendientes de madres alimentadas con dieta HF y dieta control, con o sin tratamiento con metformina, a los 60 días de edad (PND 60). En base a los resultados anteriores (figuras 8 y 9) los grupos tratados con metformina poseen una menor razón que los grupos no tratados.

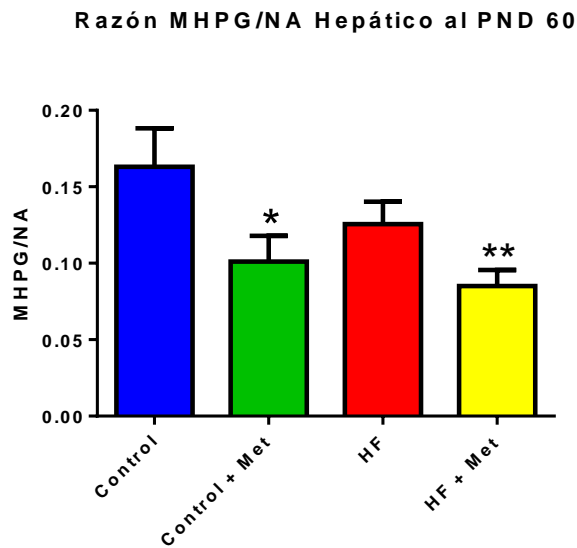


Figura 10: Razón de las concentraciones de 3-metoxi- 4-hidroxi-fenilglicol (MHPG) y Noradrenalina (NA) en hígado. El gráfico representa la razón de las concentraciones de MHPG/NA al día postnatal 60 de los grupos Control (n = 10), Control + Met (n=9), HF (n=9) y HF + Met (n=10). Los resultados se expresan como el promedio ± EEM. La significancia se obtuvo mediante el test de ANOVA con post test de Fisher. Los resultados se expresan como el promedio ± EEM. * = P<0.05 vs Control. ** = P<0.01 vs Control.

Expresión de TH en hígado

En la siguiente figura observamos los niveles de expresión para la enzima Tirosina Hidroxilasa (TH) respecto al gen constitutivo GAPDH (en hígado), de ratas descendientes de madres alimentadas con dieta HF y dieta control, con o sin tratamiento con metformina, a los 60 días de edad (PND 60).

Los grupos tratados con metformina poseen mayor expresión de esta enzima que los grupos no tratados. En el caso de estos, el grupo HF posee una menor expresión que el grupo Control.

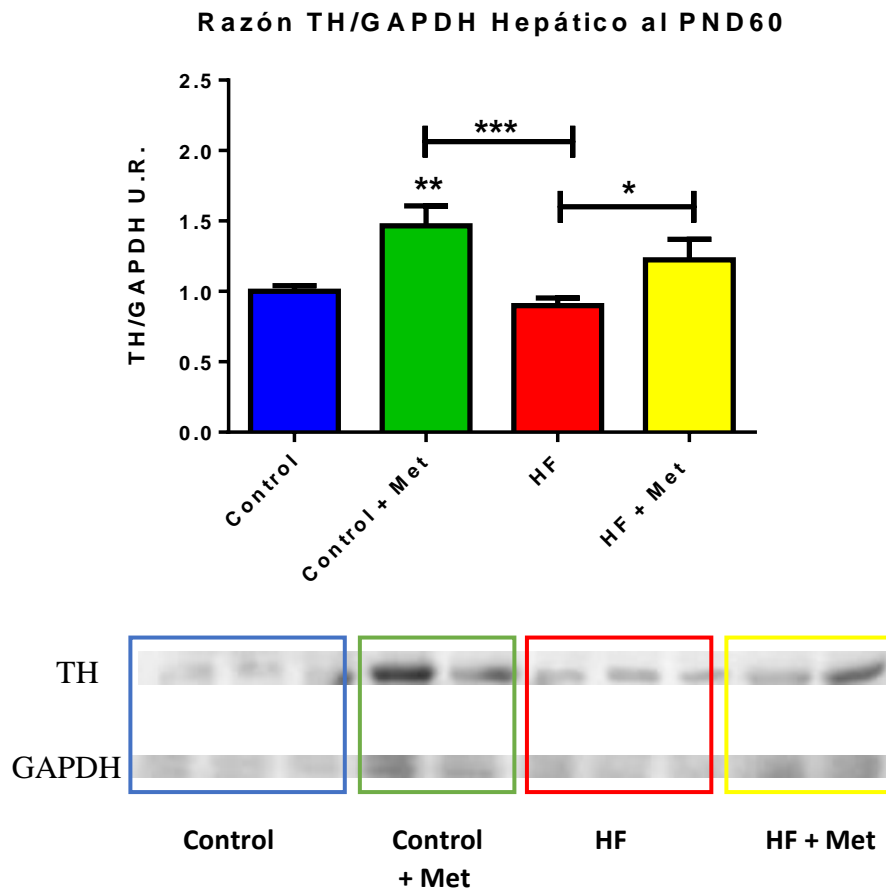


Figura 11: Razón TH/GAPDH Hepático al PND60. El gráfico representa la expresión de la enzima Tirosina Hidroxilasa respecto al gen constitutivo GAPDH, expresada en Unidades Relativas (TH/GAPDH U.R.), al día postnatal 60 (PND 60) de los grupos Control (n = 10), Control + Met (n=8), HF (n=10) y HF + Met (n=8). Los resultados se expresan como el promedio \pm EEM. La significancia se obtuvo mediante el test de ANOVA con post test de Fisher. * = $P < 0.05$ vs HF + Met, ** = $P < 0.01$ vs Control, *** = $P < 0.001$ vs HF.

Expresión de PYGL (Glucógeno Fosforilasa) en hígado

En las Figuras 12 y 13 observamos los resultados de un RT-qPCR realizado en el gen constitutivo GAPDH y la enzima PYGL. En la primera se aprecia la Curva de Disociación o Curva de Melting, el cual indica si existe un único producto o no, en base a la temperatura específica del producto. Al momento de analizar las muestras estas deberán coincidir en su gran mayoría en un solo “peak”. Esto no ocurrió con las muestras para la identificación de GAPDH ni para PYGL. Además, si observamos la Figura 13 que nos muestra el ciclo en el que amplifican las muestras, tampoco coinciden. Debido a esto y al tiempo destinado para los experimentos, los resultados no pudieron ser graficados, pero repetirán en una próxima oportunidad.

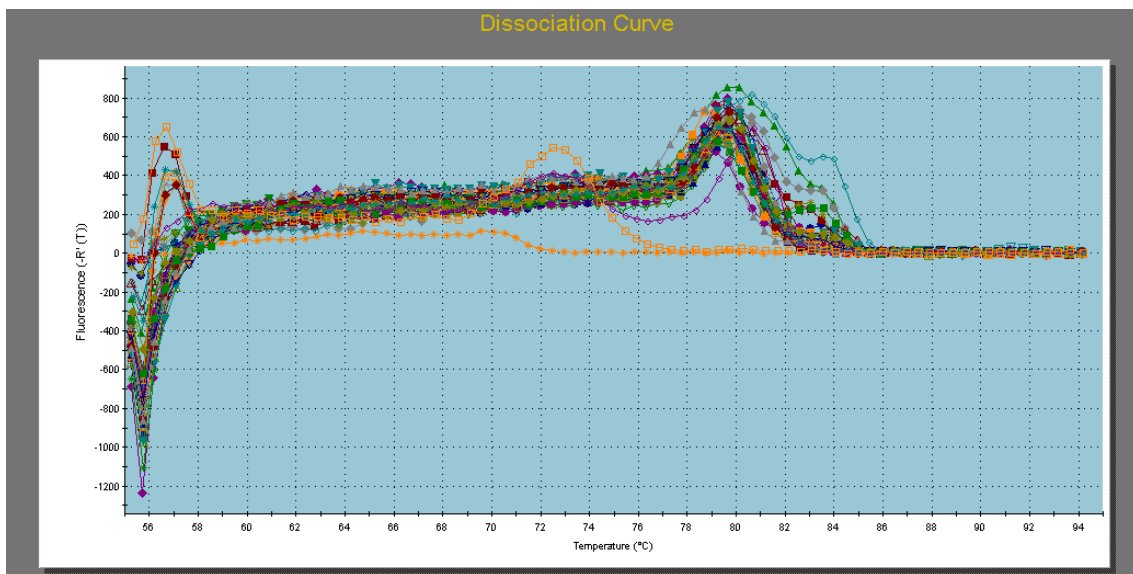
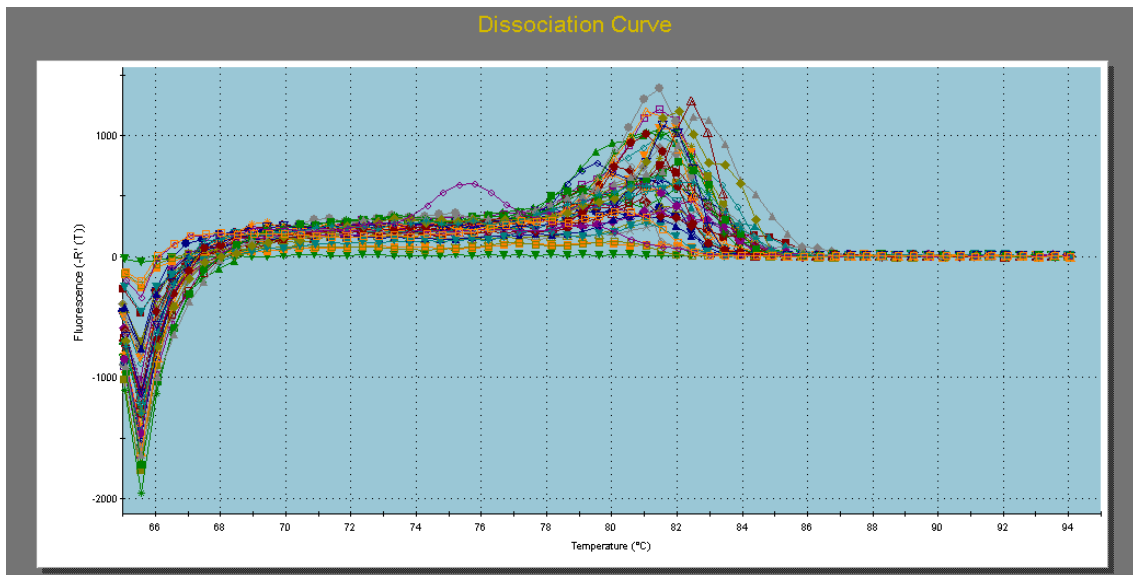


Figura 12: Curva de Disociación para PYGL y GAPDH respectivamente. El gráfico representa la temperatura específica de formación de cada producto (Curva de Melting) a través de la fluorescencia producida. Para ambos gráficos se observan que existen que no coinciden en un punto, si no que poseen varios “peaks” (debido a contaminación, por ejemplo).

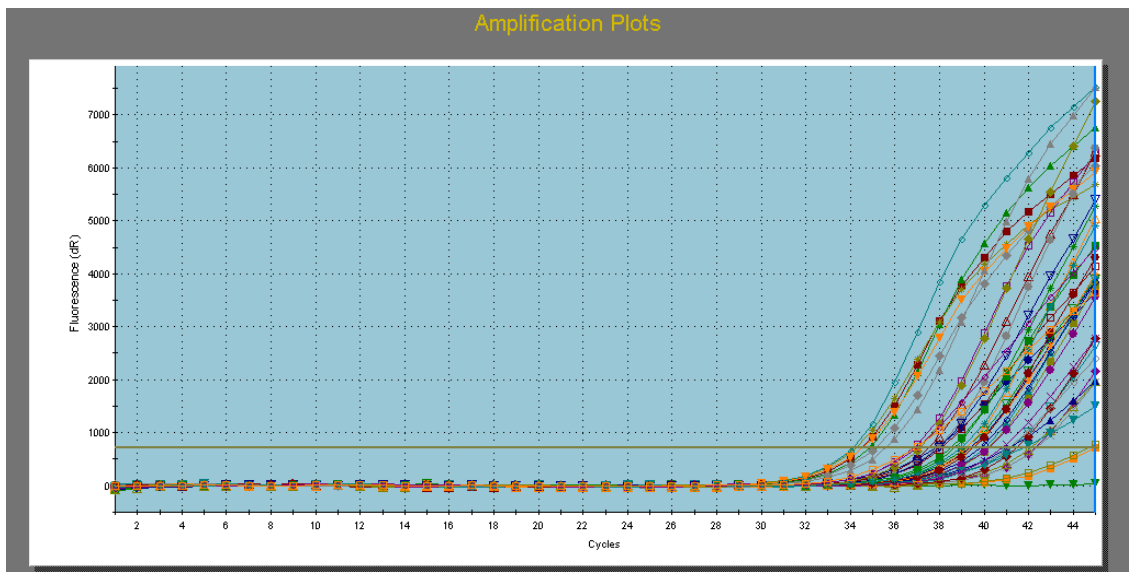
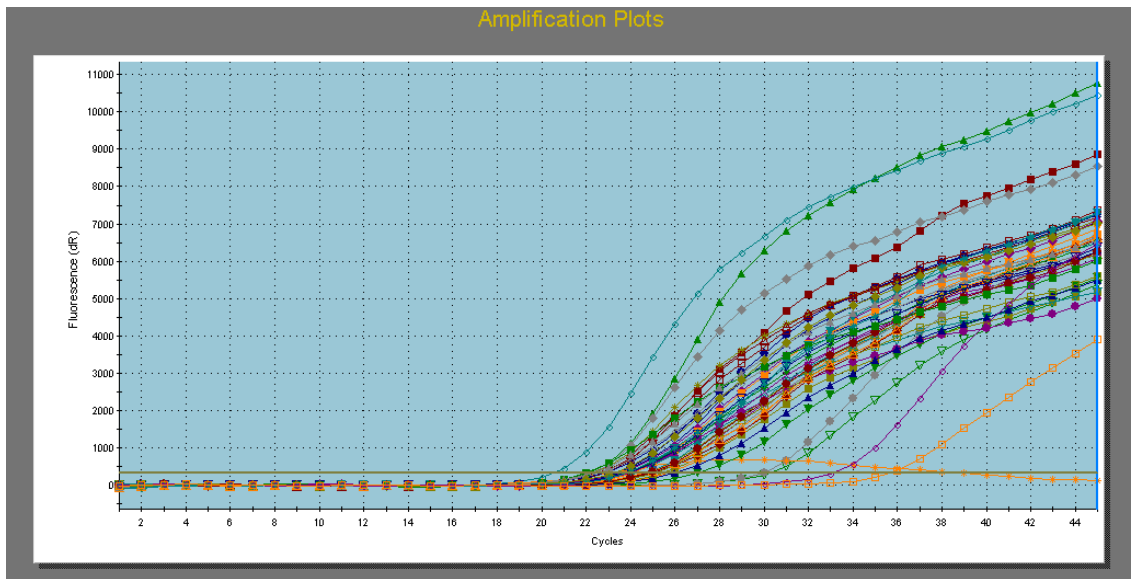


Figura 13: Curva de Amplificación para PYGL y GAPDH respectivamente. En el eje Y se muestra la cantidad de fluorescencia y en el eje X los ciclos de la reacción. En este caso las curvas no corresponden a los productos esperados, además tienden a amplificar en distintos ciclos (por contaminación, por ejemplo).

Discusión

En nuestro país existen cifras preocupantes en la prevalencia de obesidad materna durante el embarazo, la cual es un factor de riesgo para sufrir diversas complicaciones como preeclampsia, diabetes gestacional, malformaciones fetales y macrosomía fetal, entre otras complicaciones [42]. Según las estadísticas del Programa Salud de la Mujer, en el Sistema Público de Salud en Chile, el 5,1% de las mujeres que ingresaron a control prenatal el 2012 tenían diabetes. De éstas, las clasificadas como alto riesgo obstétrico y que tenían un diagnóstico de diabetes aumentaron desde un 11,9% en el 2010 a un 17,7% el 2012 [43]. La obesidad en mujeres gestantes bajo control y atendidas en el sistema público aumentó desde un 27,87% en el año 2014 a un 29,93% en el año 2015 [44]. Actualmente, según los primeros resultados de la ENS (Encuesta Nacional de Salud) 2016 – 2017 se observa un notable aumento de la sospecha de diabetes mellitus en la población chilena, destacando un 14% al año actual en la población femenina adulta [45] lo cual es alarmante considerando que un porcentaje de ellas podría cursar con diabetes durante el embarazo.

La Guía Clínica de Diabetes y Embarazo recomienda el tratamiento con metformina para la diabetes gestacional sólo en el caso de que la dieta no logre un control adecuado de la glicemia, o en aquellas pacientes que rechazan el tratamiento con insulina [46]. Aun así, existen controversias sobre el uso de este euglicemiante durante el embarazo pues este fármaco es capaz de atravesar la placenta y, al igual que con la obesidad materna, causar un “*programming*” en la descendencia [47]. En el presente estudio se investigaron los potenciales efectos de metformina administrada durante la gestación sobre el control

metabólico realizado por el sistema nervioso simpático en el hígado de la descendencia de madres obesas.

Niveles elevados de NA pueden contribuir al desarrollo del hígado graso no alcohólico por diversos mecanismos, incluyendo un aumento de la gluconeogénesis y lipogénesis hepática, como también la estimulación de la lipólisis en el tejido adiposo visceral. En este sentido, nuestro laboratorio ha demostrado que el consumo de una dieta alta en grasa durante la gestación y la lactancia produce un aumento del tono simpático, traduciéndose en una mayor concentración de NA en el hígado [19]. En el presente estudio reafirmamos este hallazgo observando una tendencia a una mayor concentración hepática de noradrenalina en las crías de madres obesas, además de una menor razón MHPG/NA, que es indicativo de una menor degradación de NA. Una posible explicación de esta activación simpática en la descendencia de madres obesas puede ser la hiperleptinemia neonatal. La leptina es una hormona anorexígena secretada principalmente por el tejido adiposo, cuya función es disminuir la ingesta de alimentos y aumentar el gasto energético. Varias evidencias indican que la leptina puede activar al sistema nervioso simpático por su efecto a nivel hipotalámico y sobre el tejido blanco [48-50]. Como parte del contenido de la leche materna encontramos a la leptina [51-53] siendo ésta la principal fuente para las crías en la primera mitad del periodo de lactancia. Notablemente, la leptina es absorbida como tal en el sistema digestivo inmaduro de las ratas durante el periodo de lactancia [54]. El estado nutricional de la madre influye en la composición de la leche materna. En este sentido, se ha evidenciado que un mayor Índice de Masa Corporal (IMC) materno, traducido como una mayor adiposidad, se correlaciona positivamente con el contenido de leptina en la leche

materna [53] [55]. Sin embargo, los efectos de dicho aumento sobre la descendencia aún se encuentran en discusión debido, entre otros factores, a una gran variabilidad del contenido de leptina en la leche materna durante la lactancia [56]. Otra explicación que conduce a la hiperleptinemia neonatal puede ser la producción endógena de esta hormona en el tejido adiposo del neonato. Es por ello, que debemos considerar que el contenido de la leche materna de la madre obesa es alto en grasas [57] lo que sumado a una mayor ingesta lleva a un aumento del peso corporal y de tejido adiposo en las crías, conduciendo a una secreción elevada de leptina.

Para ejercer su función, leptina se une a su receptor en diversos núcleos del hipotálamo, activando el sistema de las melanocortinas [58]. El receptor de melanocortina 4 (MCR4R) se ha relacionado con el aumento del estímulo simpático en Tejido Adiposo Pardo (BAT por sus siglas en inglés) y Riñón [59] [60]. En el contexto de la hiperleptinemia neonatal es posible que el desarrollo y maduración del SNS se vea alterado. Respecto a esto, un estudio (conceicao) muestra que la hiperleptinemia neonatal conduce a una mayor concentración de catecolaminas en la glándula adrenal debido al aumento en expresión de tirosina hidroxilasa y DOPA descarboxilasa, que son enzimas clave para la síntesis de catecolaminas. El incremento de leptina posee efectos también sobre tejido adiposo, aumentando la lipólisis y el contenido de AGL en el torrente sanguíneo de las crías, mediante una activación del sistema nervioso simpático, lo que contribuye a una sobrecarga de AGL en el hígado.

En cuanto a los efectos directos del SNS sobre el hígado, un tono simpático aumentado puede alterar la expresión y actividad de enzimas Gluconeogénicas. En el presente estudio

y debido a dificultades técnicas no fue posible cuantificar la expresión de las enzimas: ACC, PYGL y PEPCK. Sin embargo, en nuestro laboratorio ya se ha evidenciado que en crías de madres obesas la expresión de las enzimas ACC y PYGL se encuentran aumentadas en comparación con el grupo control [19]. En este contexto existe la posibilidad de que el aumento del tono adrenérgico sea una de las causantes de dichos resultados.

El peso corporal en las crías de madres con dieta control y dieta alta en grasa, no presenta diferencias significativas en este estudio. Sin embargo, observamos que la obesidad materna posee un efecto sobre la grasa retroperitoneal (RpAT) en la descendencia, incrementando su peso. Este compartimiento graso (junto al omental y mesentérico), es reconocido como un factor de riesgo para el síndrome metabólico, con implicancias en enfermedades cardiovasculares y el aumento de citoquinas proinflamatorias [61-63], las cuales también se han encontrado en el contenido de la leche materna en madres obesas [64]. En este sentido, el aumento de procesos proinflamatorios por el incremento de RpAT estaría contribuyendo al riesgo de NAFLD tanto para la madre [65] como para la descendencia [66] [67].

En el desarrollo del presente trabajo se ha evidenciado que el tratamiento con metformina en madres gestantes obesas y controles conduce a cambios en el tono simpático de la descendencia, y que este hecho podría representar una programación fetal inducida por el fármaco. Nuestros resultados indican que, en crías de madres tratadas con metformina, independiente de la dieta materna, aumenta la concentración de noradrenalina hepática respecto al grupo sin tratamiento. Junto a esto, también existe una expresión

incrementada de la enzima TH y una razón MHPG/NA disminuida respecto a los grupos no tratados. Esto nos indica que la síntesis de NA se amplifica en la descendencia de madres tratadas con el fármaco y que su degradación se reduce. Es posible que este último punto se deba a una alteración en las enzimas COMT o MAO, que podría afectar el metabolismo de noradrenalina a MHPG. Dichos resultados se traducen como un aumento de la actividad simpática y podría inferirse un efecto estimulador sobre la gluconeogénesis hepática.

El principal efecto de metformina es sobre la actividad del complejo I mitocondrial, lo que disminuye la carga de energía del nucleótido de adenina, aumentando la relación [AMP]:[ATP], que a su vez activa la enzima Adenosina Monofosfato Kinasa (AMPK) en el hígado e inhibiría la gluconeogénesis hepática [68]. Por medio de este mecanismo, la enzima ACC se fosforila, disminuyendo las vías de síntesis de lípidos, dando a lugar a la oxidación de grasas. Esto, reduciría las reservas de lípidos y mejoraría la sensibilidad insulina hepática [69]. En el caso de la enzima PYGL se ha observado que disminuye durante la incubación de metformina en cultivo celular hepático, por lo que la liberación de combustible gluconeogénico se vería posiblemente disminuida [70]. Por último, se ha demostrado que la supresión de la gluconeogénesis por parte de metformina requiere una proteína-treonina quinasa, la cinasa hepática B1 (LKB1). LKB1 fosforila AMPK y, a través del objetivo de la rapamicina C2 (TORC2), y reduce el coactivador 1 α de PPAR γ (PGC1 α), como resultado PEPCCK disminuye su expresión [71]. Otros efectos de metformina sobre el metabolismo incluyen la inhibición de la lipogénesis y estimulación la Beta Oxidación de los AG [72]. Es interesante notar que todos los efectos de la metformina son beneficiosos en los individuos que la consumen en cuanto al metabolismo de glucosa y de lípidos. Sin

embargo, nosotros observamos efectos opuestos a los descritos anteriormente en las crías de madres tratadas con metformina. En nuestro estudio, la descendencia nunca consumió metformina, por lo tanto, todos los efectos observados son probablemente debido a la exposición del feto a este fármaco o a los cambios metabólicos que se producen en la madre gestante o nodriza. En este sentido, una disminución del ATP intracelular como efecto del fármaco provocaría una deprivación energética en el feto que se encuentra en desarrollo, alterando probablemente la trayectoria de las células que forman los diversos tejidos y sistemas. En este caso, metformina produciría una “programación fetal” que resultaría de la exposición del feto a un ambiente similar a una de desnutrición o subnutrición prenatal, conllevando a alteraciones metabólicas en la edad adulta [73] [48].

Se ha demostrado que Metformina se transporta a través a través de placenta [73-76] a través de transportadores del tipo OCT (Organic Cation transporters). Resultados en ensayos donde se midieron muestras de sangre materna y cordón umbilical de madres en tratamiento con metformina, han demostrado que el feto está expuesto a concentraciones de este medicamento iguales o más altas que las observadas en la madre [77]. Por último, en un estudio realizado en tejido placentario de madres con Síndrome de Ovario Poliquístico (patología caracterizada por obesidad, hiperinsulinemia y síndrome metabólico) se observó una expresión reducida de transportador de NA, lo cual se asocia con una alta actividad nerviosa simpática durante el embarazo. El tratamiento con metformina durante la gestación en estas madres aumentó la expresión de los transportadores de NA placentarios, por lo que este fármaco sería capaz de modular la actividad nerviosa simpática [78].

El fármaco también se ha encontrado en leche materna [79], pero en pequeñas cantidades, que son seguras para el neonato [80]. De igual manera, la evidencia que apoya esta recomendación es escasa [79] [81] [82].

La sobrenutrición materna conduce a una acumulación adiposa, llevando a una mayor secreción de las citoquinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 desde los adipocitos o células inflamatorias. Estas citoquinas proinflamatorias regulan la sensibilidad a la insulina hepática a través de la activación de la señalización inflamatoria y la inhibición de la señalización del receptor de insulina: El resultado es el desarrollo de esteatosis hepática y fibrosis [83]. A pesar de no existir resultados en nuestros estudios sobre estos marcadores, Desai et al. [84] describe que metformina disminuiría la inflamación fetal causada por una dieta altamente calórica y el síndrome metabólico en la madre. Este fármaco, además, es capaz de inhibir la producción de IL-1 de macrófagos a través de la activación de AMPK *in vitro*, reduciendo su maduración [85]. Si bien el mecanismo molecular no está aclarado, se postula que es causado por una activación de la autofagia a través de la estimulación de AMPK [86].

En el Anexo 1 observamos el incremento ponderal de las crías del estudio, donde se evidencian diferencias del peso corporal entre los grupos desde el PND 7. Es interesante observar que el grupo Control-Metformina posee un peso levemente mayor que el grupo no tratado y que podría justificarse como un efecto “Catch-up” debido al ambiente de restricción intrauterina producido por metformina durante la gestación, mientras que el grupo HF + Met posee un peso corporal menor al grupo no tratado. Aunque el impacto de metformina sobre el peso corporal, es existente, se ha evidenciado que no posee un impacto

importante en el síndrome metabólico (rango de disminución de peso: 1 – 5 Kg) [87]. De igual manera, y según nuestros resultados, el peso de RpAT en la descendencia de madres tratadas con dieta alta en grasa y tratada metformina, disminuye su peso respecto al grupo sin tratar.

Curiosamente y a pesar de no obtener resultados significativos respecto al Peso Hepático, un estudio evidenció un aumento de este parámetro en crías tratadas con metformina debido a una acumulación de grasa hepática, en base al aumento de la grasa mesentérica [48]. Uno de los mecanismos que podría explicar a nivel molecular esta programación es el de PPAR (Receptor activado por el proliferador de peroxisoma) siendo un blanco terapéutico para tratar NAFLD mediante la modulación de diversas vías que se ven afectadas por la obesidad [88] [89]. PPAR - alfa ha sido objetivo de investigación al estar relacionado con la beta - oxidación de los ácidos grasos en la mitocondria, y con ello, con la enzima Carnitina Palmitoil Transferasa-1 (CPT-1) y su alteración conlleva a una acumulación de triglicéridos en el hígado, provenientes de la lipólisis [90] [91]. Dicho fenómeno se ha visto en estudios de ratones alimentados con dieta alta en grasa, donde una disminución de la expresión de PPAR – alfa se tradujo en sobrepeso, resistencia a la insulina y aumento de esteatosis hepática por factores proinflamatorios [92], características del NAFLD. Dichos efectos se producen por la relación del receptor con cascadas de señalización, como la red de señalización AMPK-Sirt1-PPAR α . (Sirt1: sirtuína-1 deacetilasa dependiente de NAD).

Por otro lado, y en el contexto de progresión de la insulino-resistencia, al aumentar las concentraciones de insulina en sangre y también lo hace las concentraciones de IGF-1 [93]. Se ha observado que la metformina ejerce su efecto sobre las vías de señalización de

insulina e IGF-1 mediante la activación de AMPK de una manera similar a la observada durante la restricción calórica [94].

Como ya se ha mencionado, no se ha podido graficar los resultados del RT-qPCR para las enzimas ACC, PYGL y PEPCK debido a que la Curva de Melting obtenida no fue aceptable, indicando productos de la reacción inespecíficos. Algunas de las posibles causas son: contaminación de las muestras (lo que generaría más de un *peak* en la Curva de Disociación), inconvenientes durante la fase de RT del experimento (mal preparación de los *mix*, que conlleva a resultados bajos y muy variables entre las muestras), diseño de los partidores, degradación del RNA de las muestras o problemas del funcionamiento del equipo lector de placas (qPCR). En una próxima oportunidad y teniendo en consideración todas las variables que pudieron dificultar el experimento y con el tiempo adecuado para llevarlos a cabo, este experimento se realizará nuevamente.

Finalizando, tanto el tratamiento con metformina como las alteraciones metabólicas causadas por la obesidad en la madre juegan un papel crucial en la gestación y en la programación fetal de la descendencia. En este trabajo se evidenció modificaciones en el tono simpático, especialmente en Noradrenalina y la MHPG/NA. En este sentido, el aumento de la síntesis de noradrenalina con una posible disminución en su degradación se traduce en una alteración de la innervación del sistema nervioso simpático con posibles consecuencias sobre enzimas gluconeogénicas y aumento del riesgo de NAFLD. El hígado graso no alcohólico es una enfermedad multifactorial, con muchos mecanismos aún por aclararse. A futuro sería adecuado complementar el estudio con análisis histológico del hígado, de niveles de triglicéridos, insulina sérica y leptina sérica para los diferentes

grupos estudiados en los mismos animales en que se realizó este estudio. Así también sería interesante observar qué ocurre con los niveles de IGF-1, AMPK y PPAR-Alfa en las crías de madres tratadas con metformina.

Conclusiones

- 1) Los niveles de NA en hígado de crías descendientes de madres alimentadas con dieta HF se encuentran aumentados respecto al grupo control. Sin embargo, el tratamiento con metformina acrecenta más estas concentraciones, disminuyendo la razón MHPG/NA.
- 2) Los niveles de TH en hígado de crías descendientes de madres alimentadas con dieta HF se encuentran disminuidas respecto al grupo control, mientras que en las crías cuyas madres fueron tratadas con metformina aumentaron estos niveles. Esto explicaría el aumento de la síntesis de NA de estos grupos.
- 3) El peso de la grasa Retroperitoneal se encuentra aumentada en crías con dieta HF, respecto al grupo control. El tratamiento con metformina reduce estos niveles, lo que se traduce en el uso de este compartimiento y una elevación de ácidos grasos en el plasma. Esto último se convierte en un posible factor de riesgo para la patogénesis de NAFLD.

Bibliografía

1. OMS. Organización Mundial de la Salud 2017 [cited 2017 Abril]; Available from: www.who.int.
2. MINSAL. Encuesta Nacional de Salud 2009-2010 2010 [cited 2017 Abril]; Available from: web.minsal.cl/portal/url/item/bcb03d7bc28b64dfe040010165012d23.pdf.
3. DEIS. *Resumen Estadístico Mensual DEIS*. 2012; 2012:[Available from: <http://www.deis.cl/rem-2012/>].
4. Flenady, V., et al., *Major risk factors for stillbirth in high-income countries: a systematic review and meta-analysis*. Lancet, 2011. **377**(9774): p. 1331-40.
5. Rooney, B.L., C.W. Schauburger, and M.A. Mathiason, *Impact of perinatal weight change on long-term obesity and obesity-related illnesses*. Obstet Gynecol, 2005. **106**(6): p. 1349-56.
6. Lucas, A., *Programming by early nutrition in man*. Ciba Found Symp, 1991. **156**: p. 38-50; discussion 50-5.
7. Marciniak, A., et al., *Fetal programming of the metabolic syndrome*. Taiwan J Obstet Gynecol, 2017. **56**(2): p. 133-138.
8. McCurdy, C.E., et al., *Maternal high-fat diet triggers lipotoxicity in the fetal livers of nonhuman primates*. J Clin Invest, 2009. **119**(2): p. 323-35.
9. Shankar, K., et al., *Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008. **294**(2): p. R528-38.

10. Shankar, K., et al., *Maternal overweight programs insulin and adiponectin signaling in the offspring*. Endocrinology, 2010. **151**(6): p. 2577-89.
11. Oben, J.A., et al., *Maternal obesity during pregnancy and lactation programs the development of offspring non-alcoholic fatty liver disease in mice*. J Hepatol, 2010. **52**(6): p. 913-20.
12. Zhang, L., et al., *Increased susceptibility of prenatal food restricted offspring to high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease is intrauterine programmed*. Reprod Toxicol, 2016. **65**: p. 236-247.
13. Matteoni, C.A., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity*. Gastroenterology, 1999. **116**(6): p. 1413-9.
14. Dietrich, P. and C. Hellerbrand, *Non-alcoholic fatty liver disease, obesity and the metabolic syndrome*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2014. **28**(4): p. 637-53.
15. Bellentani, S., et al., *Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease*. Dig Dis, 2010. **28**(1): p. 155-61.
16. Solis Herruzo, J.A., et al., *Non-alcoholic fatty liver disease. From insulin resistance to mitochondrial dysfunction*. Rev Esp Enferm Dig, 2006. **98**(11): p. 844-74.
17. Manne, V., P. Handa, and K.V. Kowdley, *Pathophysiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease/Nonalcoholic Steatohepatitis*. Clin Liver Dis, 2018. **22**(1): p. 23-37.
18. Buzzetti, E., M. Pinzani, and E.A. Tsochatzis, *The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)*. Metabolism, 2016. **65**(8): p. 1038-48.
19. Cortez, J., C. Rojas, and G. Cruz, *Influencia del sistema adrenérgico en el desarrollo de enfermedad de hígado graso no alcohólico en la descendencia de ratas con obesidad gestacional*". 2016, Universidad de Valparaíso.

20. Bringhenti, I., et al., *Early hepatic insult in the offspring of obese maternal mice*. Nutr Res, 2015. **35**(2): p. 136-45.
21. Proost, C., H. Carton, and H. De Wulf, *The alpha-adrenergic control of rabbit liver glycogenolysis*. Biochem Pharmacol, 1979. **28**(14): p. 2187-91.
22. Shimazu, T., *Central nervous system regulation of liver and adipose tissue metabolism*. Diabetologia, 1981. **20 Suppl**: p. 343-56.
23. Peaston, R.T. and C. Weinkove, *Measurement of catecholamines and their metabolites*. Ann Clin Biochem, 2004. **41**(Pt 1): p. 17-38.
24. Kantorovich, V., K.S. King, and K. Pacak, *SDH-related pheochromocytoma and paraganglioma*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2010. **24**(3): p. 415-24.
25. Cuenca, E., *Introducción a la Fisiología. Funciones Vegetativas.*, in *Fundamentos de la Fisiología*. 2006, Thomson. p. 586.
26. Abdollahi, M., et al., *Effects of phosphodiesterase 3,4,5 inhibitors on hepatocyte cAMP levels, glycogenolysis, gluconeogenesis and susceptibility to a mitochondrial toxin*. Mol Cell Biochem, 2003. **252**(1-2): p. 205-11.
27. Fain, J.N., et al., *Cyclic nucleotides and gluconeogenesis by rat liver cells*. Metabolism, 1975. **24**(3): p. 395-407.
28. Gil, A., *Tratado de Nutrición*, in *Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición*. 2005.
29. Favaro, E., et al., *Glucose utilization via glycogen phosphorylase sustains proliferation and prevents premature senescence in cancer cells*. Cell Metab, 2012. **16**(6): p. 751-64.

30. Ashino, N.G., et al., *Maternal high-fat feeding through pregnancy and lactation predisposes mouse offspring to molecular insulin resistance and fatty liver*. J Nutr Biochem, 2012. **23**(4): p. 341-8.
31. Alberts, A.W. and P.R. Vagelos, *Acetyl CoA carboxylase. I. Requirement for two protein fractions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1968. **59**(2): p. 561-8.
32. Koeberl, D.D., et al., *Early, sustained efficacy of adeno-associated virus vector-mediated gene therapy in glycogen storage disease type Ia*. Gene Ther, 2006. **13**(17): p. 1281-9.
33. Uygun, A., et al., *Metformin in the treatment of patients with non-alcoholic steatohepatitis*. Aliment Pharmacol Ther, 2004. **19**(5): p. 537-44.
34. Bugianesi, E., et al., *A randomized controlled trial of metformin versus vitamin E or prescriptive diet in nonalcoholic fatty liver disease*. Am J Gastroenterol, 2005. **100**(5): p. 1082-90.
35. Aydin, Y., et al., *Is insulin lispro safe in pregnant women: Does it cause any adverse outcomes on infants or mothers?* Diabetes Res Clin Pract, 2008. **80**(3): p. 444-8.
36. Rouabhia, S., N. Milic, and L. Abenavoli, *Metformin in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease: safety, efficacy and mechanism*. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2014. **8**(4): p. 343-9.
37. Schwartz, R. and K.A. Teramo, *Effects of diabetic pregnancy on the fetus and newborn*. Semin Perinatol, 2000. **24**(2): p. 120-35.
38. Guo, F. and K.L. Jen, *High-fat feeding during pregnancy and lactation affects offspring metabolism in rats*. Physiol Behav, 1995. **57**(4): p. 681-6.

39. Elahi, M.M., et al., *Long-term maternal high-fat feeding from weaning through pregnancy and lactation predisposes offspring to hypertension, raised plasma lipids and fatty liver in mice*. Br J Nutr, 2009. **102**(4): p. 514-9.
40. Álvarez, D., G. Olgún, and G. Cruz, *Efectos del tratamiento con metformina previo y durante la preñez en ratas madres obesas sobre la función reproductiva de la descendencia femenina*. 2015, Universidad de Valparaíso.
41. Araya, S. and G. Cruz, *Efecto de la administración de metformina previo y durante la preñez sobre el control adrenérgico ovárico de la descendencia de ratas con obesidad gestacional inducida por la dieta*. 2017, Universidad de Valparaíso.
42. Gao, F., et al., *Type 2 diabetes mitigation in the diabetic Goto-Kakizaki rat by elevated bile acids following a common-bile-duct surgery*. Metabolism, 2016. **65**(2): p. 78-88.
43. DEIS. *Resumen Estadístico Mensual DEIS*. 2012; 2012:[Available from: <http://www.deis.cl/rem-2012/>].
44. DEIS. *Resumen Estadístico Mensual (REM)*. Departamento de Estadísticas e Información de Salud. 2014 [cited 2017 Abril]; Available from: www.deis.cl.
45. Departamento de Epidemiología, D.d.P.S.M. *Encuesta Nacional de Salud 2016 - 2017. Primeros Resultados*. 2017 [cited 2017 Diciembre]; Available from: http://web.minsal.cl/wp-content/uploads/2017/11/ENS-2016-17_PRIMEROS-RESULTADOS.pdf.
46. MINSAL, D.E.n.T.D.C.V., *Guía de Diabetes y Embarazo*. 2015: MINSAL.

47. Salomaki, H., et al., *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): p. e115778.
48. Qi, Z. and S. Ding, *Obesity-associated sympathetic overactivity in children and adolescents: the role of catecholamine resistance in lipid metabolism*. J Pediatr Endocrinol Metab, 2016. **29**(2): p. 113-25.
49. Pellegrino, M.J., B.H. McCully, and B.A. Habecker, *Leptin stimulates sympathetic axon outgrowth*. Neurosci Lett, 2014. **566**: p. 1-5.
50. Zeng, W., et al., *Sympathetic neuro-adipose connections mediate leptin-driven lipolysis*. Cell, 2015. **163**(1): p. 84-94.
51. Casabiell, X., et al., *Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(12): p. 4270-3.
52. Badillo-Suarez, P.A., M. Rodriguez-Cruz, and X. Nieves-Morales, *Impact of Metabolic Hormones Secreted in Human Breast Milk on Nutritional Programming in Childhood Obesity*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2017. **22**(3): p. 171-191.
53. Kuganathan, S., et al., *Leptin Levels Are Higher in Whole Compared to Skim Human Milk, Supporting a Cellular Contribution*. Nutrients, 2016. **8**(11).
54. Sanchez, J., et al., *Leptin orally supplied to neonate rats is directly uptaken by the immature stomach and may regulate short-term feeding*. Endocrinology, 2005. **146**(6): p. 2575-82.
55. Savino, F., et al., *Mother and Infant Body Mass Index, Breast Milk Leptin and Their Serum Leptin Values*. Nutrients, 2016. **8**(6).

56. Doneray, H., Z. Orbak, and L. Yildiz, *The relationship between breast milk leptin and neonatal weight gain*. *Acta Paediatr*, 2009. **98**(4): p. 643-7.
57. Saben, J., et al., *Maternal obesity is associated with a lipotoxic placental environment*. *Placenta*, 2014. **35**(3): p. 171-7.
58. Watzek, J.S., et al., *Perinatal nutrition programs the hypothalamic melanocortin system in offspring*. *Horm Metab Res*, 2013. **45**(13): p. 980-90.
59. Taylor, P.D., A.M. Samuelsson, and L. Poston, *Maternal obesity and the developmental programming of hypertension: a role for leptin*. *Acta Physiol (Oxf)*, 2014. **210**(3): p. 508-23.
60. Samuelsson, U., et al., *Continued improvement of metabolic control in Swedish pediatric diabetes care*. *Pediatr Diabetes*, 2016.
61. Kwon, H., D. Kim, and J.S. Kim, *Body Fat Distribution and the Risk of Incident Metabolic Syndrome: A Longitudinal Cohort Study*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 10955.
62. Aye, I.L., et al., *Increasing maternal body mass index is associated with systemic inflammation in the mother and the activation of distinct placental inflammatory pathways*. *Biol Reprod*, 2014. **90**(6): p. 129.
63. Elffers, T.W., et al., *Body fat distribution, in particular visceral fat, is associated with cardiometabolic risk factors in obese women*. *PLoS One*, 2017. **12**(9): p. e0185403.
64. Whitaker, K.M., et al., *Associations of Maternal Weight Status Before, During, and After Pregnancy with Inflammatory Markers in Breast Milk*. *Obesity (Silver Spring)*, 2017. **25**(12): p. 2092-2099.

65. Ajmera, V.H., et al., *Gestational Diabetes Mellitus Is Strongly Associated With Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*. Am J Gastroenterol, 2016. **111**(5): p. 658-64.
66. Thompson, M.D., et al., *Enhanced Steatosis and Fibrosis in Liver of Adult Offspring Exposed to Maternal High-Fat Diet*. Gene Expr, 2016. **17**(1): p. 47-59.
67. Oben, J.A., et al., *Maternal obesity during pregnancy and lactation programs the development of offspring non-alcoholic fatty liver disease in mice*. J Hepatol, 2010. **52**(6): p. 913-20.
68. Hardie, D.G., F.A. Ross, and S.A. Hawley, *AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(4): p. 251-62.
69. Fullerton, M.D., et al., *Single phosphorylation sites in Acc1 and Acc2 regulate lipid homeostasis and the insulin-sensitizing effects of metformin*. Nat Med, 2013. **19**(12): p. 1649-54.
70. Otto, M., J. Breinholt, and N. Westergaard, *Metformin inhibits glycogen synthesis and gluconeogenesis in cultured rat hepatocytes*. Diabetes Obes Metab, 2003. **5**(3): p. 189-94.
71. Shaw, R.J., et al., *The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin*. Science, 2005. **310**(5754): p. 1642-6.
72. Rouabhia, S., N. Milic, and L. Abenavoli, *Metformin in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease: safety, efficacy and mechanism*. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2014. **8**(4): p. 343-9.
73. Kovo, M., et al., *Determination of metformin transfer across the human placenta using a dually perfused ex vivo placental cotyledon model*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2008. **136**(1): p. 29-33.

74. Kovo, M., et al., *Carrier-mediated transport of metformin across the human placenta determined by using the ex vivo perfusion of the placental cotyledon model*. Prenat Diagn, 2008. **28**(6): p. 544-8.
75. Nanovskaya, T.N., et al., *Transfer of metformin across the dually perfused human placental lobule*. Am J Obstet Gynecol, 2006. **195**(4): p. 1081-5.
76. Terti, K., et al., *The role of organic cation transporters (OCTs) in the transfer of metformin in the dually perfused human placenta*. Eur J Pharm Sci, 2010. **39**(1-3): p. 76-81.
77. Vanky, E., et al., *Placental passage of metformin in women with polycystic ovary syndrome*. Fertil Steril, 2005. **83**(5): p. 1575-8.
78. Medina, G., et al., *Metformin increases norepinephrine transporter expression in placenta of patients with polycystic ovary syndrome*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017. **21**(15): p. 3482-3489.
79. Briggs, G.G., et al., *Excretion of metformin into breast milk and the effect on nursing infants*. Obstet Gynecol, 2005. **105**(6): p. 1437-41.
80. Kalra, B., et al., *Use of oral anti-diabetic agents in pregnancy: a pragmatic approach*. N Am J Med Sci, 2015. **7**(1): p. 6-12.
81. Hale, T.W., et al., *Transfer of metformin into human milk*. Diabetologia, 2002. **45**(11): p. 1509-14.
82. Gardiner, S.J., et al., *Transfer of metformin into human milk*. Clin Pharmacol Ther, 2003. **73**(1): p. 71-7.
83. Malin, S.K. and S.R. Kashyap, *Effects of metformin on weight loss: potential mechanisms*. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2014. **21**(5): p. 323-9.

84. Desai, N., et al., *Maternal metformin treatment decreases fetal inflammation in a rat model of obesity and metabolic syndrome*. Am J Obstet Gynecol, 2013. **209**(2): p. 136 e1-9.
85. Cho, M.H., et al., *Autophagy in microglia degrades extracellular beta-amyloid fibrils and regulates the NLRP3 inflammasome*. Autophagy, 2014. **10**(10): p. 1761-75.
86. Geisler, C.E. and B.J. Renquist, *Hepatic lipid accumulation: cause and consequence of dysregulated glucoregulatory hormones*. J Endocrinol, 2017. **234**(1): p. R1-R21.
87. Arshad, R., et al., *Effects of Diet and Metformin on placental morphology in Gestational Diabetes Mellitus*. Pak J Med Sci, 2016. **32**(6): p. 1522-1527.
88. Mansour, M., *The roles of peroxisome proliferator-activated receptors in the metabolic syndrome*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2014. **121**: p. 217-66.
89. Serviddio, G., et al., *Oxidation of hepatic carnitine palmitoyl transferase-I (CPT-I) impairs fatty acid beta-oxidation in rats fed a methionine-choline deficient diet*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e24084.
90. Yu, G.S., Y.C. Lu, and T. Gulick, *Co-regulation of tissue-specific alternative human carnitine palmitoyltransferase I beta gene promoters by fatty acid enzyme substrate*. J Biol Chem, 1998. **273**(49): p. 32901-9.
91. Souza-Mello, V., *Peroxisome proliferator-activated receptors as targets to treat non-alcoholic fatty liver disease*. World J Hepatol, 2015. **7**(8): p. 1012-9.
92. Souza-Mello, V., et al., *Comparative effects of telmisartan, sitagliptin and metformin alone or in combination on obesity, insulin resistance, and liver and*

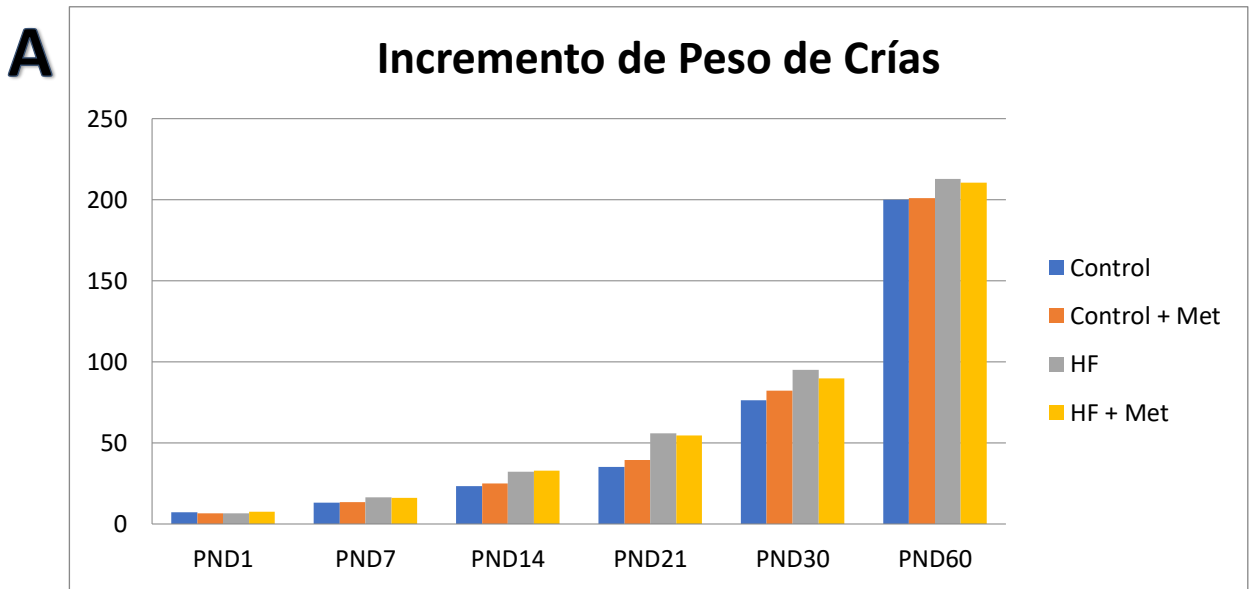
pancreas remodelling in C57BL/6 mice fed on a very high-fat diet. Clin Sci (Lond), 2010. 119(6): p. 239-50.

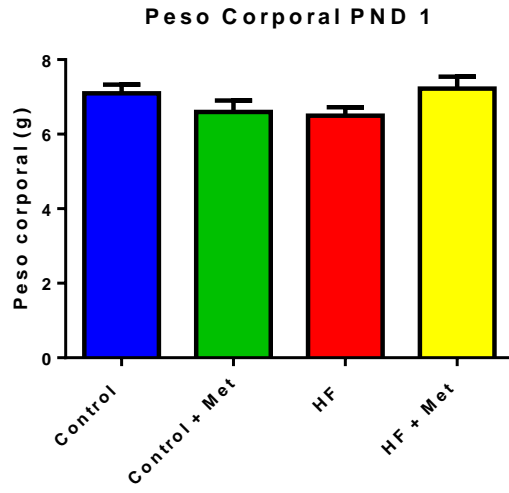
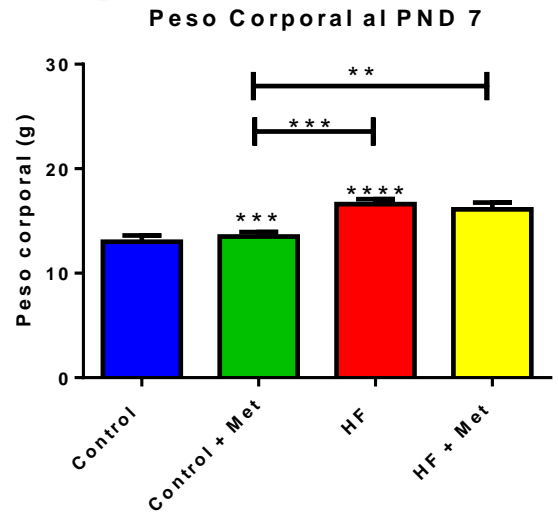
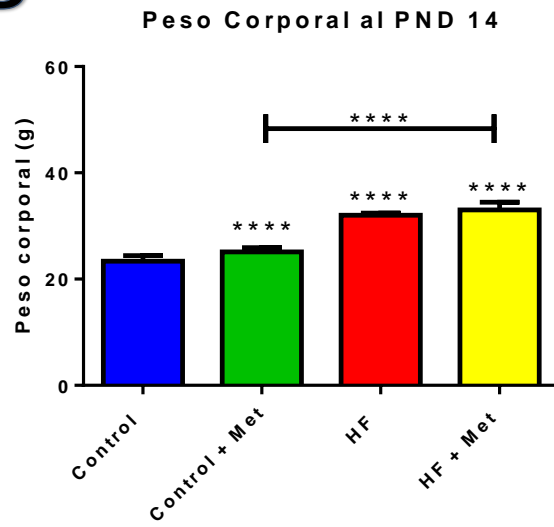
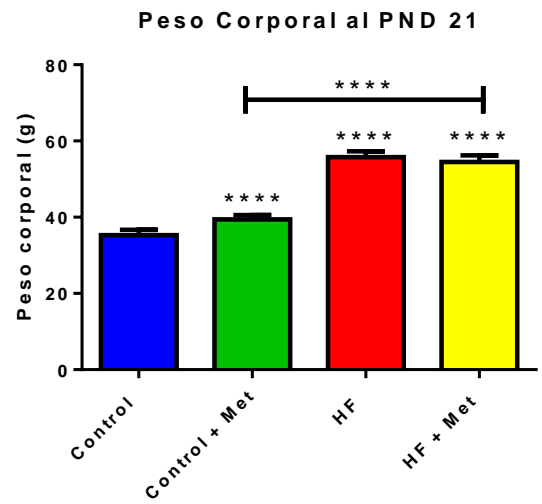
93. Wainwright, P., E. Scorletti, and C.D. Byrne, *Type 2 Diabetes and Hepatocellular Carcinoma: Risk Factors and Pathogenesis. Curr Diab Rep, 2017. 17(4): p. 20.*
94. Karmali, R., et al., *All in the family: Clueing into the link between metabolic syndrome and hematologic malignancies. Blood Rev, 2015. 29(2): p. 71-80.*

Anexos

Anexo 1

Incremento de Peso de Crías según PND.



B**C****D****E**

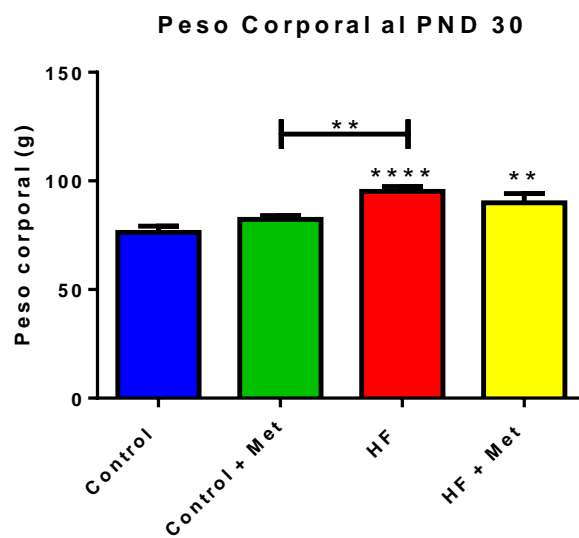
F

Figura 14: Peso Corporal de Crías PND 1 al PND 60. (a) Incremento de Peso de las Crías, por grupo y PND. En los siguientes gráficos (b), (c), (d), (e) y (f) se muestra el peso corporal (en gramos) de las crías al PND 1, 7, 14, 21 y 30, respectivamente. Los resultados se expresan como el promedio \pm EEM. La significancia se obtuvo mediante el test de ANOVA con post test de Fisher. * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$ *** = $P < 0.001$.

