



**Universidad
de Valparaíso
CHILE**



FACULTAD DE FARMACIA
ESCUELA DE NUTRICIÓN Y DIETÉTICA
CARRERA DE NUTRICIÓN Y DIETÉTICA

**“EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON METFORMINA PREVIO Y DURANTE
LA PREÑEZ EN RATAS MADRES OBESAS SOBRE LA FUNCIÓN
REPRODUCTIVA DE LA DESCENDENCIA FEMENINA”**

DANIELA PATRICIA ÁLVAREZ ARAVENA
GUMERCINDA DEL CARMEN OLGUÍN MALDONADO

Tesis para optar al título de Nutricionista
Grado académico de Licenciado de Nutrición y Dietética

DIRECTOR: GONZALO CRUZ NECULPÁN PhD
INFORMANTES: SEBASTIÁN SAN MARTÍN HENRÍQUEZ PhD
CLAUDIA VEGA SOTO MSc

Valparaíso, 2015.

FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue financiada principalmente por el proyecto FONDECYT INICIACION 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.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente a mi familia por el apoyo y comprensión, por respetar mis decisiones y apoyar en los momentos más difíciles de este largo proceso. A Cristóbal por entregar fuerza y ánimo cuando yo no los tenía. A Sofía por ser una gran compañera y amiga.

Daniela

Por su apoyo incondicional, agradezco a mi familia por los largos años acompañándome a la distancia, por su gran esfuerzo y dedicación y por creer en mí y en mis capacidades. A Antonio Rodó, agradezco por estar conmigo, por su ánimo infinito en los momentos más difíciles. A Daniela... agradezco tu paciencia, por comprender mi forma de ser, por subirme el ánimo en los momentos de estrés y cansancio. Finalmente, agradezco a Dios por darme fuerza y guiarme en este proceso de aprendizaje y conocimiento.

Sofía

Agradecemos a los integrantes de nuestro laboratorio, por acompañarnos en este proceso. A Tania y Jonathan por el tiempo y dedicación entregados. A Karina e Isabella, por su valiosa ayuda sin esperar nada a cambio y a Amanda por su apoyo emocional en este proceso.

Finalmente, infinitas gracias a nuestro querido profesor Gonzalo Cruz, por creer desde el principio en nosotras, por brindarnos su tiempo, por descubrir capacidades que ni siquiera conocíamos y por su apoyo incondicional. Agradecemos también a su familia por su comprensión y colaboración.

ÍNDICE

FINANCIAMIENTO	3
AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN.....	8
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	10
HIPÓTESIS.....	15
OBJETIVOS	16
Objetivo General	16
Objetivos Específicos	16
METODOLOGÍA	17
1. Tipo de estudio.....	17
2. Variables	17
3. Animales	17
4. Control de peso e ingesta diaria de alimentos y agua	19
5. Tratamiento con Metformina	19
6. Apertura vaginal.....	19
7. Evaluación de la ciclicidad estral mediante frotis vaginal	19
8. Morfología ovárica.....	20

9. Determinación de los niveles séricos de estradiol, LH e insulina por Inmuno-ensayo ligado a enzima (ELISA).....	20
11. Determinación Índice HOMA-IR.....	21
12. Análisis Estadístico	21
RESULTADOS.....	22
Evaluación de parámetros metabólicos y antropométricos en la descendencia femenina de ratas madres controles, obesas y obesas tratadas con metformina previo y durante la preñez.	22
1. Peso Corporal.....	22
2. Ingesta de alimento	23
3. Peso hígado	24
4. Histología Hepática PND 60.....	24
5. Peso grasa PND60	25
6. Metabolismo glucídico	26
7. Apertura vaginal	27
8. Cuantificación de ciclos estrales.....	28
Niveles de estradiol sérico, su síntesis y/o metabolismo.....	29
1. Estradiol sérico PND 14	29
2. Estradiol Sérico PND 60.....	30
Morfología ovárica y perfil hormonal reproductivo.....	31

1. Niveles de LH sérica.....	31
2. Morfología Ovárica.....	32
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIONES	41
BIBLIOGRAFÍA	42
Anexo 1. Acta de Evaluación Bioética.....	46

RESUMEN

En Chile existe una mayor prevalencia de obesidad en mujeres que en hombres, lo que lleva a que un 50% de mujeres embarazadas presente malnutrición por exceso de nutrientes. En humanos y en animales de experimentación se ha demostrado que la obesidad gestacional produce alteraciones reproductivas y metabólicas. Recientemente nuestro laboratorio ha reportado que las alteraciones reproductivas pueden ser producto de un aumento de estradiol debido a una menor metabolización hepática de éste. Nuestra hipótesis es que el tratamiento con metformina en ratas madres con obesidad inducida por dieta, previene el adelanto de la pubertad, las alteraciones foliculares y la formación de quistes ováricos en la descendencia femenina. Utilizamos ratas de la cepa Sprague-Dawley sometidas a dieta control o alta en grasa (HF). A un subgrupo de las ratas HF se les administró metformina previo y durante la preñez. Analizamos el peso corporal, peso hepático, histología hepática, niveles de glucosa plasmática, niveles plasmáticos de estradiol y folículos antrales y cuerpos lúteos en la descendencia. El tratamiento con metformina no pudo revertir el aumento de peso, sin embargo previene el aumento de estradiol, el adelanto de la pubertad y la formación de quistes ováricos producido por la obesidad gestacional. Aunque nosotros observamos una mejoría de ciertos parámetros metabólicos y reproductivos, consideramos que la administración de metformina en madres obesas debe ser evaluada en mayor profundidad antes de concluir que tiene un efecto beneficioso a largo plazo.

ABSTRACT

In Chile there is a greater prevalence of obesity in women than in men, leading to 50% of pregnant women presenting malnutrition by excess nutrients. In humans and in experimental animals which were offspring of obese mothers, reproductive and metabolic disorders have been observed. Recently our laboratory has reported that reproductive abnormalities may result from an increase in estradiol due to decreased hepatic metabolism of the hormone. We hypothesized that treatment with metformin in female rats with diet-induced obesity, prevents the advancement of puberty, follicular abnormalities and ovarian cyst formation in female offspring. We use Sprague-Dawley rats under control or high fat diet (HF). Subsets of HF rats were administered with metformin prior and during pregnancy. We analyze body weight, liver weight, liver histology, serum glucose and estradiol levels, antral follicles and corpora lutea in the offspring. Metformin did not reverse the weight gain or follicular abnormalities in the offspring, however it prevents the increase of estradiol and therefore the advancement of puberty produced by gestational obesity. Although we observed an improvement of certain metabolic and reproductive parameters, we consider metformin in obese mothers should be evaluated further before concluding that have a beneficial long-term effect.

INTRODUCCIÓN

La malnutrición por exceso, ya sea sobrepeso u obesidad, está definida como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. El exceso de peso es producto de un balance energético positivo, debido a un consumo excesivo de alimentos hipercalóricos y/o a una disminución de la actividad física [1]. A nivel mundial, alrededor del 52% de la población adulta presenta algún grado de malnutrición por exceso, de los cuales el 39% corresponde a sobrepeso y un 13% a obesidad (11% hombres y 15% mujeres) [1].

La obesidad puede repercutir de diversas formas en la salud de las personas, siendo asociada a una serie de enfermedades tales como diabetes mellitus tipo 2, hipertensión arterial y dislipidemia, alteraciones que forman parte del síndrome metabólico. Se ha encontrado una relación entre la obesidad y patologías gastrointestinales, algunos tipos de cáncer y enfermedades reproductivas como síndrome de ovario poliquístico (SOP)[2], diabetes gestacional y macrosomía en el recién nacido [3].

Según la Encuesta Nacional de Salud del año 2010, respecto a la encuesta realizada el año 2003, en Chile existe una alta y creciente prevalencia de obesidad en todas las etapas del ciclo vital, determinando la existencia de aproximadamente 4 millones de personas obesas a lo largo del país [4]. Es posible apreciar una mayor prevalencia de obesidad en mujeres, con un 30,7%, respecto a la población masculina representada por un 19,2%.

En las mujeres embarazadas, los índices de obesidad han aumentado desde 13% a un 32% en sólo 15 años [5], cifras que coinciden con los datos entregados por el Sistema Nacional de Servicios de Salud (SNSS), el cual refiere que más del 50% de la población de embarazadas bajo control presenta algún grado de sobrepeso u obesidad [4].

La obesidad tiene un impacto relevante sobre la función reproductiva de la mujer, destacando alteraciones como infertilidad, aborto espontáneo y un mayor número de partos asistidos, entre otras complicaciones obstétricas [6]. Por otra parte, mujeres obesas gestantes tienen un aumento significativo del riesgo de presentar hipertensión arterial e infecciones post parto [7, 8]. El exceso de peso materno se asocia también a un mayor índice de mortalidad perinatal y malformaciones congénitas como defectos cardíacos, del tubo neural y onfalocele en los recién nacidos [9, 10]. Esta condición se ha relacionado también con un incremento en el número de recién nacidos macrosómicos (≥ 4.000 g), los cuales superan el 10% del total de nacimientos. Diversos estudios indican que un mayor peso de nacimiento se relaciona con un mayor riesgo de presentar obesidad en etapas posteriores de la vida [7].

La observación de que un estímulo o injuria ocurrido en etapas tempranas de la vida o durante un período crítico del desarrollo, resulta en cambios permanentes o a largo plazo en la estructura o función del organismo, da origen al concepto de “Programming” o “Programación del Desarrollo” [11]. Evidencia epidemiológica y estudios en animales indican que hay una programación de la obesidad y otras enfermedades de la adultez debido a influencias multifactoriales que ocurren en etapas tempranas de la vida [12]. Dentro de ellas, en modelos de desnutrición materna, se ha evidenciado que la descendencia presenta aumento de peso e hiperfagia [13, 14], además de niveles séricos elevados de leptina en la adultez [15]. Por otra parte, se ha observado que la descendencia de roedores que presentan obesidad materna inducida por dieta presentan hiperfagia, aumento de la adiposidad, hipertensión arterial [16], insulinoresistencia, aumento de la gluconeogénesis hepática [17] e hiperleptinemia [15, 18], factores claves en el desarrollo de síndrome metabólico. Otros

estudios, con un modelo de obesidad materna inducida por dieta alta en grasa durante la preñez y la lactancia, señalan ésta condición como un factor predisponente de resistencia a la insulina, hígado graso e hiperlipidemia en la descendencia, además de incrementar mediadores proinflamatorios relevantes en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular [19, 20]. Se ha demostrado también una disfunción del endotelio vascular y anormalidades en perfil lipídico [21, 22].

Estudios en ratas, afirman que una dieta materna alta en grasa induce en la descendencia alteraciones reproductivas tales como adelanto de la pubertad, anormalidad de los ciclos reproductivos [23, 24], niveles elevados de progesterona [25] y un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama [26]. Estudios epidemiológicos indican que existe una relación inversa entre el índice de masa corporal (IMC) materno y la edad de presentación de la menarquia en las hijas, donde a mayor IMC de las madres, menor edad de menarquia [27].

En los diversos modelos de obesidad inducida por la dieta en ratas, se observa efectos similares a modelos de exposición a estrógenos en etapa neonatal, tales como adelanto de la pubertad [28], alteración en la ciclicidad estral, presencia de quistes foliculares, ausencia de cuerpos lúteos, lo que provoca cambios en el desarrollo folicular y da lugar a la condición de ovario poliquístico [29, 30]. Además se ha determinado otras anormalidades reproductivas de la descendencia femenina, tales como adenocarcinoma de células vaginales y del cuello uterino, ciclos menstruales intermitentes o ausentes y reducción de la fertilidad [31].

En estudios previos de nuestro laboratorio, al evaluar las alteraciones reproductivas de la descendencia femenina de madres con obesidad gestacional inducida por una dieta, es posible apreciar un aumento del peso corporal, cambios en la folículoogénesis con una

reducción del desarrollo folicular, presencia de quistes ováricos y adelanto de la pubertad [32], aun cuando todas las crías fueron alimentadas con una dieta control posterior al destete. Además se observa un incremento en los niveles de estradiol sérico en distintas edades, tales como los días post natal (PND) 1, 7, 14 [33], 30 [34] y 60 [32]. Este aumento de estradiol sérico podría ser provocado por una mayor síntesis o una disminución de su metabolización a nivel hepático. En base a los supuestos anteriores, se realizaron estudios en donde se midió la expresión ovárica del gen *cyp19*, que codifica para la enzima aromatasa, limitante en la síntesis y capacidad ovárica de secreción de estradiol, en los cuales se puede apreciar que ratas hijas de madres sometidas a una dieta alta en grasa no presentaron variaciones en la expresión de *cyp19* respecto al grupo control, y además no se encuentra aumentada la capacidad ovárica de secreción de estradiol ex-vivo, lo que no explica el aumento de estradiol sérico y la pubertad adelantada en ratas pre-púberes hijas de madres obesas [34]. Con la finalidad de determinar la causa del aumento de estradiol, se evaluó la expresión de *CYP3a2* en hígado, enzima encargada de metabolizar el estradiol a nivel hepático. Resultados aún no publicados de nuestro grupo muestran que los niveles de *CYP3a2* en hígado de ratas hijas de madres obesas se encuentran disminuidos en los días PND 14, PND 30 y PND 60.

Basado en la evidencia descrita, son múltiples las alteraciones reproductivas producidas en la descendencia femenina como consecuencia de la obesidad materna, siendo esta última el enfoque principal de este trabajo. Estudios epidemiológicos en mujeres obesas con SOP que fueron sometidas a un tratamiento con metformina, muestran que éstas tuvieron una reducción del IMC, circunferencia de cintura y perfil lipídico [35, 36]. La metformina es un fármaco de aplicación oral recomendado en el tratamiento de primera línea en pacientes

que presentan diabetes mellitus tipo II [37], algunos de sus efectos incluyen reducción de la enfermedad cardiovascular e incidencia de algunos tipos de cáncer. A nivel metabólico, este fármaco promueve la captación de glucosa a nivel muscular, incrementa la oxidación de ácidos grasos en músculo y hepatocitos, genera una mayor producción de óxido nítrico y disminución de la producción de radicales libres e inhibe la gluconeogénesis y lipogénesis hepática [38]. La reducción de la gluconeogénesis y la lipogénesis en hígado se asocia a mejorar alteraciones metabólicas como la esteatosis hepática [39]. Estudios que evalúan los efectos del tratamiento con metformina en mujeres embarazadas con SOP han demostrado que disminuye la incidencia de diabetes gestacional en comparación al grupo control [40, 41]. Se ha evidenciado que el tratamiento con metformina mejora el perfil de ovulación en mujeres con SOP que presentan hiperandrogenismo [42].

A modo de síntesis, resultados anteriores indican que durante la preñez en madres con obesidad inducida por dieta, los fetos podrían estar expuestos a mayores niveles de estradiol, que sería responsable del *programming* metabólico en la descendencia, la cual presenta obesidad y un fenotipo de esteatosis hepática con disminución en los niveles de la enzima CYP3a2. Estos niveles aumentados de estradiol permanecen elevados durante todo el ciclo vital.

La efectividad de la metformina en la reducción del peso corporal, la gluconeogénesis y lipogénesis en hígado, revertiría la esteatosis hepática mejorando la funcionalidad de éste órgano. De esta forma sería capaz de metabolizar correctamente el estradiol sérico circundante, evitando de ésta manera las alteraciones reproductivas como el adelanto de la pubertad, alteraciones foliculares y formación de quistes ováricos que genera la obesidad gestacional en la progenie.

HIPÓTESIS

El tratamiento con metformina previo y durante la preñez en ratas madres con obesidad inducida por una dieta alta en grasa, previene el adelanto de la pubertad, las alteraciones foliculares y la formación de quistes ováricos en la descendencia femenina.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la efectividad del tratamiento con metformina previo y durante la preñez en prevenir la pubertad precoz, las alteraciones foliculares y la formación de quistes ováricos en ratas hijas de madres obesas.

Objetivos Específicos

1. Determinar parámetros metabólicos y antropométricos en la descendencia femenina de ratas madres controles, obesas y obesas tratadas con metformina previo y durante la preñez.
2. Evaluar los niveles de estradiol, su síntesis y/o metabolismo en ratas hijas de ratas madres controles, obesas y obesas tratadas con metformina previo y durante la preñez.
3. Caracterizar las alteraciones morfológicas ováricas y perfil hormonal reproductivo en la descendencia femenina adulta de ratas madres controles, obesas y obesas tratadas con metformina previo y durante la preñez.

METODOLOGÍA

1. Tipo de estudio

Estudio analítico experimental longitudinal prospectivo.

2. Variables

Peso corporal (g), ingesta de alimento (g), peso hepático (mg), peso grasa (mg), glicemia (mg/dl), insulina plasmática (ng/ml), edad de inicio de la pubertad, número de ciclos estrales, niveles de estradiol (pg/ml) y LH (pg/ml), número de folículos antrales sanos, atrésicos, cuerpos lúteos y quistes ováricos.

3. Animales

Para este estudio se utilizaron 31 ratas hembras de la cepa Sprague Dawley de 200-250g de peso las cuales fueron distribuidas en tres grupos experimentales: 9 ratas con dieta control (Dieta Champion: 23% Proteína, 64% Hidratos de Carbono, 13% Lípidos, equivalentes a 4 Kcal/g), 10 con dieta alta en grasa (High Fat: HF, Research Diet™ USA; 20% Proteína, 20% Hidratos de Carbono y 60% Lípidos, equivalentes a 5 Kcal/g) y 12 con dieta alta en grasa tratadas con Metformina. Los animales se mantuvieron 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, con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas, con agua y comida *ad libitum*. El señor Guillermo Rodríguez se encargó del [43] lavado de jaulas y la srta. Tania Cerda del seguimiento del peso corporal, control de ciclicidad estral, ingesta de alimentos y agua de los animales, ambos capacitados en la mantención y cuidado de animales de experimentación. Las 2 primeras semanas de mantención de los animales corresponde al periodo de aclimatación, en el cual todos los

grupos experimentales fueron alimentados con dieta control. Se registró diariamente la ingesta alimentaria y de líquidos mediante el pesaje diario de la comida y el agua, peso corporal y ciclicidad estral a través de frotis vaginal. Desde la tercera semana, cada grupo experimental fue alimentado con su dieta respectiva, control y HF, la cual se mantuvo hasta el periodo de destete correspondiente a los 21 días de edad de las crías. Para el grupo tratado con dieta HF + Metformina, el fármaco se administró una semana antes del periodo de cruce y durante la preñez. Las ratas serán consideradas obesas cuando se exista diferencia estadística significativa entre el grupo control y los grupos tratados con dieta HF [43, 44]. Las ratas fueron cruzadas después de 4 semanas de dieta control o HF con machos reproductores alimentados con dieta control. La confirmación de la preñez se realizó mediante la observación de espermatozoides o la observación de ocho diestros consecutivos en el frotis vaginal. Las crías fueron sexadas al día postnatal 1 mediante observación genital. Posterior al periodo de destete, las crías fueron separadas de sus madres y se mantuvieron con una dieta control. Las crías se sacrificaron mediante decapitación, a los días 14, 30 y 60 de edad. Al momento de la eutanasia se recolectó sangre, ovarios, hígado y tejido adiposo. Al finalizar el período de lactancia, las ratas madres se sacrificaron por decapitación donde se recolectó sangre para extracción de suero. 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). Las series experimentales de la presente tesis están enmarcadas en el proyecto FONDECYT de iniciación en investigación N° 11130707.

4. Control de peso e ingesta diaria de alimentos y agua

Se registró diariamente el peso de las ratas madres durante el período de pre-concepción, gestación y lactancia. Las crías fueron pesadas diariamente desde su nacimiento hasta el PND 60. Se controló diariamente mediante el pesaje la cantidad de alimento y agua consumida.

5. Tratamiento con Metformina

Para el grupo de ratas tratadas con dieta alta en grasa y metformina, una semana antes de iniciar el periodo de cruce, se comenzó con el tratamiento con metformina, el cual se mantuvo hasta culminar la preñez. Se administró metformina clorhidrato 250 mg/Kg peso/día (Glaformil® MERCK), la cual fue disuelta en agua y dispuesta en bebederos para su consumo ad libitum. Se realizó un recambio de la solución de metformina tres veces a la semana.

6. Apertura vaginal

Se determinó la edad de inicio de la pubertad mediante observación de apertura vaginal a todas las crías. La apertura vaginal en ratas ocurre en promedio entre los días 30 a 50 de vida y depende de las distintas condiciones ambientales.

7. Evaluación de la ciclicidad estral mediante frotis vaginal

El registro diario de ciclicidad estral fue realizado desde la llegada de las madres hasta la confirmación de la preñez. En la descendencia, el frotis vaginal se realizó diariamente, desde el momento de la apertura vaginal hasta el día 60 de vida. Luego de extraída la

muestra de fluido vaginal diluido en agua, se realizó un frotis en un portaobjetos, el cual se observó en el microscopio óptico con una magnificación de 10x. La distribución de las células permitieron clasificar las etapas del ciclo estral como proestro, estro o diestro.

8. Morfología ovárica

Una vez extraídos los ovarios fueron inmersos en fijador Bouin donde permanecieron por 24 horas y luego fueron lavadas con etanol 70% hasta extraer la coloración amarilla intensa proveniente del ácido pícrico. Posterior al procedimiento de fijación, los ovarios fueron incluidos en parafina, cortados a un grosor de 6µm, montados en portaobjetos y teñidos con hematoxilina-eosina. Se analizaron los cortes histológicos seriados de cada ovario y se realizó el recuento total de folículos antrales sanos y antrales atrésicos, cuerpos lúteos, y quistes foliculares.

9. Determinación de los niveles séricos de estradiol, LH e insulina por Inmunoensayo ligado a enzima (ELISA)

Se realizó la determinación de estradiol a las crías mediante el análisis de las muestras de suero, para lo cual se utilizó 50 µL de suero en cada muestra obtenida en el PND 14 y 60. Los niveles de estradiol se determinaron por ELISA de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Alpco Diagnostic, USA).

Para la determinación de LH de las crías, se utilizó 50 µL de suero en cada muestra obtenida al PND 60. Los niveles de LH se determinaron por ELISA de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Cusabio Biotech CO., LTD).

Con la finalidad de determinar la insulina de las crías, se utilizó 10 uL de suera en cada muestra obtenida al PND 60. Los niveles de insulina se determinaron por ELISA de

acuerdo a las condiciones del fabricante (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, U.S.A)

10. Medición de glicemia

Se midió la glucosa en sangre al momento de la eutanasia de las ratas, donde se utilizó el hemoglucotest OneTouch[®] UltraMini[®]

11. Determinación Índice HOMA-IR

Luego de obtener los valores de glicemia e insulinemia, se procedió a determinar el índice HOMA-IR, utilizando la siguiente fórmula [45]:

$$\text{HOMA-IR} = [\text{Insulina (U/l)} \times \text{glucosa en sangre (mmol/l)}] / 22.5$$

Con los siguientes factores de conversión:

- Insulina (1U/l = 7.174 pmol/l)
- Glucose en sangre (1 mmol/l = 18 mg/dl)

12. Análisis Estadístico

Todos los resultados de esta tesis son expresados como el promedio \pm el error estándar medio (SEM). Los datos fueron analizados utilizando el programa GraphPad Prism[®] versión 6.01. Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el test de ANOVA asociado a un post test de comparación de medias (Neuman- Keuls). Se asume una distribución normal de los datos de acuerdo a lo reportado por la literatura. Se consideró * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0,0001$ para indicar diferencias estadísticamente significativas.

RESULTADOS

Evaluación de parámetros metabólicos y antropométricos en la descendencia femenina de ratas madres controles, obesas y obesas tratadas con metformina previo y durante la preñez.

1. Peso Corporal

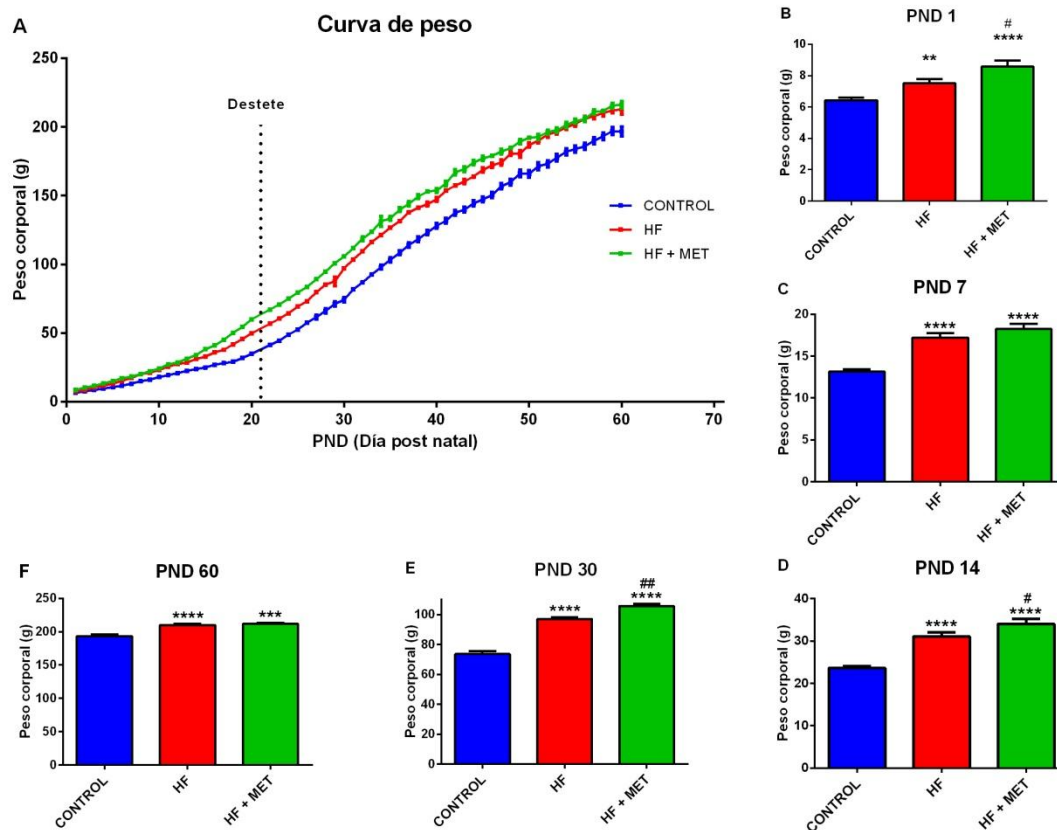


Figura 1. Peso corporal PND 1- 60. El gráfico A representa el peso corporal de las crías desde el PND 1 al 60 (n: C=37; HF=31; HF+MET=14). Se evaluó las diferencias de peso en los PND 1 (n: C=37; HF=31; HF+MET=14), 7 (n: C=37; HF=31; HF+MET=14), 14 (n: C=37; HF=31; HF+MET=14), 30 (n: C=28; HF=24; HF+MET=10) y 60 (n: C=25; HF=22; HF+MET=9) presentadas en los gráficos B, C, D, E y F respectivamente. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM. El * compara los grupos HF y HF+MET respecto al control, mientras que # compara entre HF y HF+MET. # p<0,05; ## p<0,01; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001.

La Figura 1 muestra que las crías de madres tratadas con dieta HF presentan un mayor peso corporal en todos los días evaluados con respecto a las crías de madres control. Las crías de

madre HF sometidas a tratamiento con metformina presentan un peso similar a las crías HF exceptuando los días post natal 1, 14 y 30 en que el peso de ratas cuyas madres fueron tratadas con metformina fue mayor.

2. Ingesta de alimento

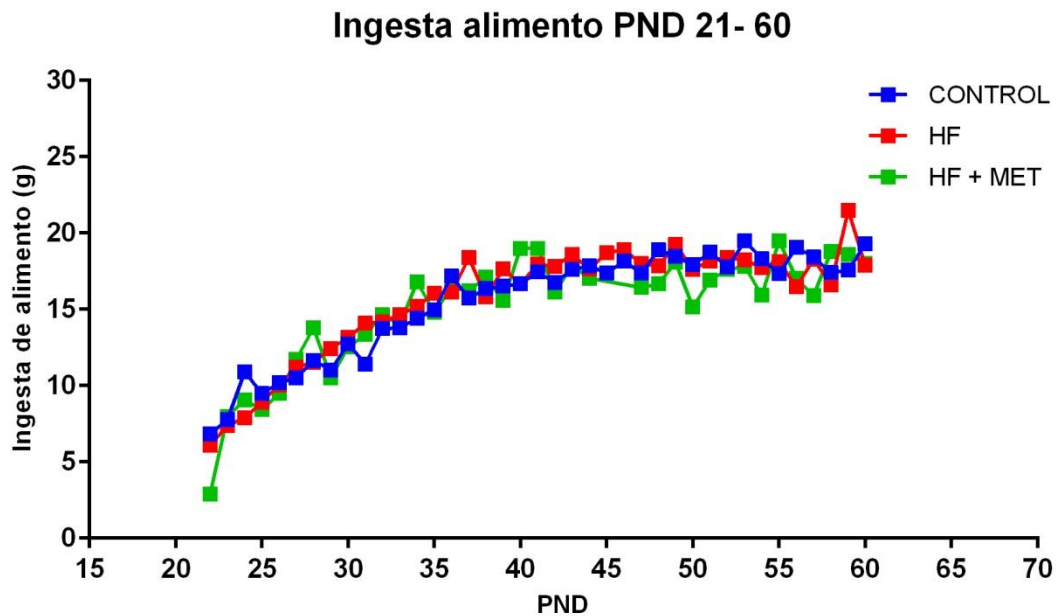


Figura 2. Ingesta de alimento PND 21- 60. Se presenta la ingesta de alimento de las crías desde el PND 21-60 (n: C=30; HF=26; HF+MET=10). Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM.

La Figura 2 muestra la ingesta de alimento desde el destete hasta el PND 60 en crías de ratas madres controles, obesas y obesas tratadas con metformina. Se puede observar que los gramos de alimento consumido por los grupos HF y HF+MET se mantienen similares a la ingesta del grupo control posterior al periodo del destete.

3. Peso hígado

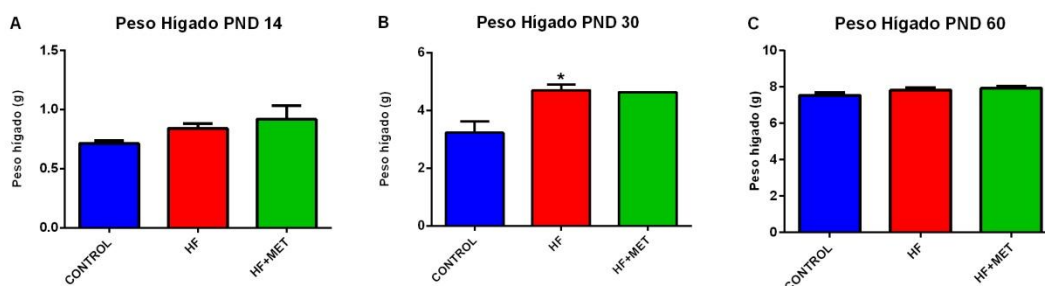


Figura 3. Peso hígado PND 14,30 y 60. El gráfico representa el peso del hígado (g) de las crías al PND 14 (n: C=5; HF=4; HF+MET=4), 30 (n: C=5; HF=4; HF+MET=1) y 60 (n: C=21; HF=22; HF+MET=8). Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM. * $p < 0,05$.

El gráfico anterior evalúa el peso del hígado en las crías al PND 14, 30 y 60. Se puede apreciar que al PND 30, el grupo HF presenta mayor peso hepático que el grupo control, mientras que al PND 14 y 60 los grupos HF y HF+MET no difieren en el peso hepático respecto al grupo control.

4. Histología Hepática PND 60

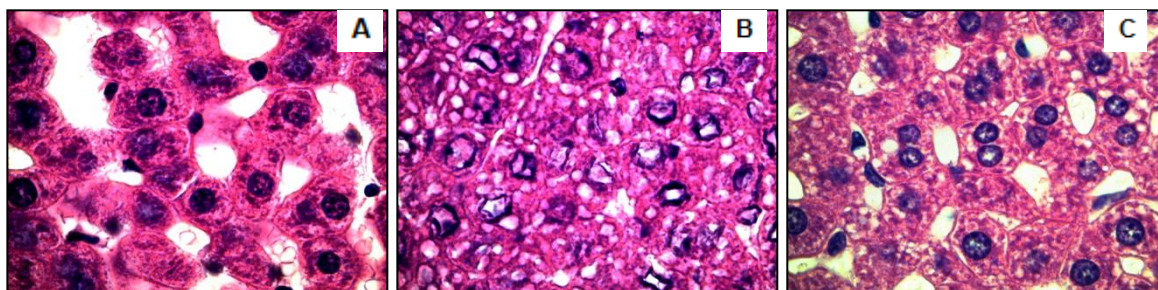


Figura 4. Histología hepática. Las imágenes A, B y C muestran cortes histológicos de ratas control, HF y HF+ MET respectivamente. Los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina-eosina.

La Figura 4 representa una sección de hígado de los distintos grupos en estudio, en la imagen A es posible identificar hepatocitos sanos. La imagen B muestra un corte histológico del hígado donde se observan hepatocitos con vacuolas lipídicas en su interior.

La imagen C representa una rata HF + MET, se aprecia menor presencia de vacuolas de grasa que en las ratas HF.

5. Peso grasa PND60

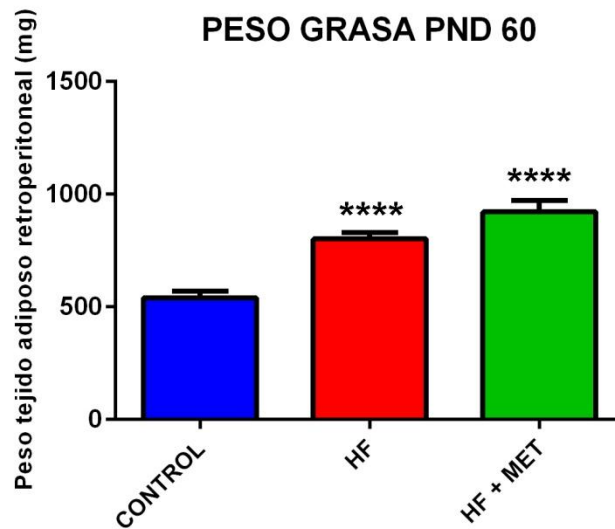


Figura 5. Peso grasa PND 60. El gráfico representa el peso de la grasa de las crías al PND 60 (n: C=27; HF=21; HF+MET=9). Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM. **** $p < 0,0001$.

En el gráfico se muestra el peso en miligramos de tejido adiposo retroperitoneal en las crías al PND60. Se observa que la cantidad de tejido adiposo es mayor en los grupos expuestos a una dieta alta en grasa, y que ésta no disminuye si la madre es tratada con metformina durante la preñez.

6. Metabolismo glucídico

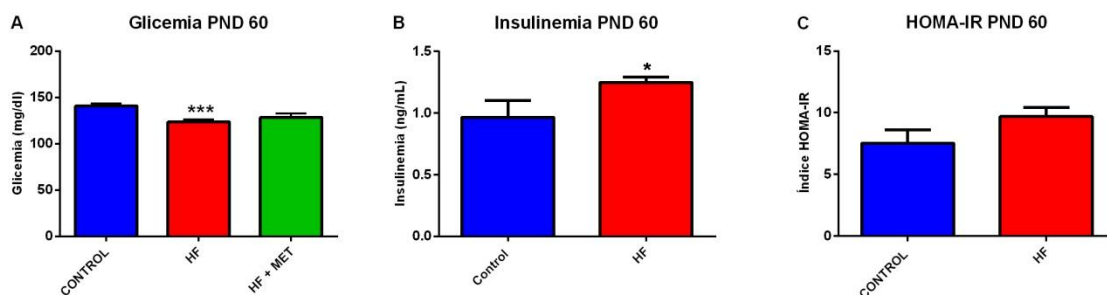


Figura 6. Metabolismo Glucídico. A) Glicemia PND 60. El gráfico representa la glicemia (mg/dL) al PND 60 (n: C=25; HF=21; HF+MET=9). **B) Insulinemia PND 60.** Se representa la insulina plasmática (ng/mL) al PND 60 (n: C=4; HF=4). **C) HOMA-IR PND 60.** El gráfico muestra el índice HOMA-IR al PND 60 para las crías control y HF (n: C=4; HF=4). Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

La Figura 6A presenta los niveles de glicemia en las crías al PND60. Se puede apreciar que los valores de glucosa en sangre son menores en las crías de madres con dieta alta en grasa, pero que las crías de madres tratadas con dieta alta en grasa y metformina presentan valores similares a las controles luego de 6 horas de ayuno. Posterior a la medición de la glicemia, se midió los niveles de insulina plasmática en ng/mL para los grupos HF y control representados en la Figura 6B. Se observa que las crías de madres alimentadas con dieta alta en grasa presentan mayores niveles de insulinemia respecto a las crías control en el PND 60.

Con la finalidad de determinar la presencia de resistencia a la insulina, se calculó el índice HOMA-IR para los grupos HF y control. El análisis estadístico indica que en las crías de madres alimentadas con una dieta alta en grasa, existe una tendencia a presentar un índice HOMA-IR mayor que las crías control. Por circunstancias experimentales no se pudo determinar el nivel de insulina en crías de madres sometidas al tratamiento con metformina.

8. Cuantificación de ciclos estrales

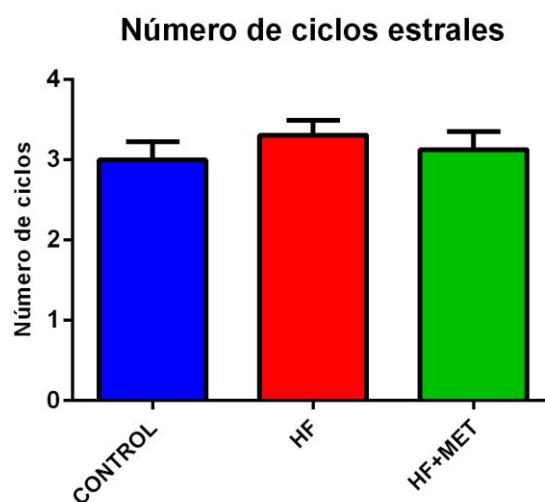


Figura 8. Número de ciclos estrales. El gráfico representa el número de ciclos estrales completos ocurridos desde la apertura vaginal hasta el PND 60 (n: C=24; HF=23; HF+MET=8). Los resultados se expresan como el promedio ± SEM.

La Figura 8 presenta la cantidad de ciclos estrales completos de los distintos grupos experimentales, ocurridos entre la edad de apertura vaginal y el PND60. En la figura se aprecia que no existe diferencia entre la cantidad de ciclos estrales entre las crías de madres sometidas a dieta alta en grasa y alta en grasa más tratamiento con metformina respecto a las crías de madres alimentadas con dieta control.

Niveles de estradiol sérico, su síntesis y/o metabolismo

1. Estradiol sérico PND 14

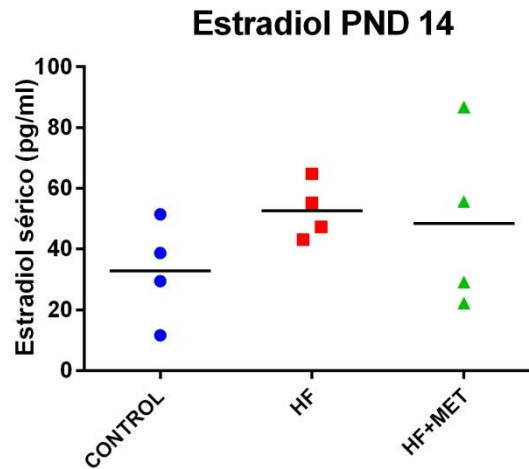


Figura 9. Niveles de estradiol PND 14. El gráfico representa la dispersión de los niveles de estradiol para los distintos grupos al PND 14 (n: C=4; HF=4; HF+MET=4).

La Figura 9 muestra los niveles de estradiol obtenidos en los individuos evaluados en los grupos control, alto en grasa y alto en grasa tratado con metformina. El gráfico indica que no existe diferencia en los niveles de estradiol en los grupos evaluados, pero aun así, se observa que las ratas del grupo alto en grasa tienen una tendencia a presentar mayores niveles de estradiol que las ratas control. Para el grupo con dieta alta en grasa tratado con metformina, se observa una amplia distribución de los datos.

2. Estradiol Sérico PND 60

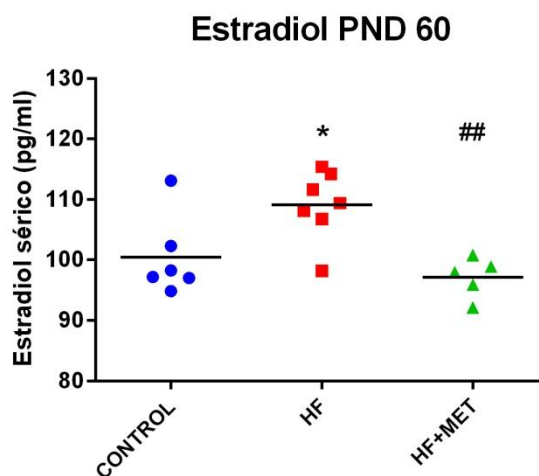


Figura 10. Niveles de estradiol PND 60. El gráfico representa los niveles de estradiol para los distintos grupos al PND 60 (n: C=6; HF=7; HF+MET=5).
* $p < 0,05$, ## $p < 0,01$

La Figura 10 representa los niveles séricos de estradiol al PND 60 para los grupos control, alto en grasa y alto en grasa tratado con metformina. Se evidencia que las ratas del grupo alto en grasa presentan mayores niveles de estradiol al PND 60 respecto a las controles. En el caso del grupo alto en grasa tratado con metformina, se observa que presentan menores niveles de estradiol que las ratas del grupo alto en grasa y que éstos son similares a los niveles de estradiol sérico de las ratas control al PND 60.

No se presenta los niveles del gen *cyp3A2* al PND 60 ya que la cantidad de RNA de las muestras en estudio está por debajo de los niveles detectables en el experimento.

Morfología ovárica y perfil hormonal reproductivo

1. Niveles de LH sérica

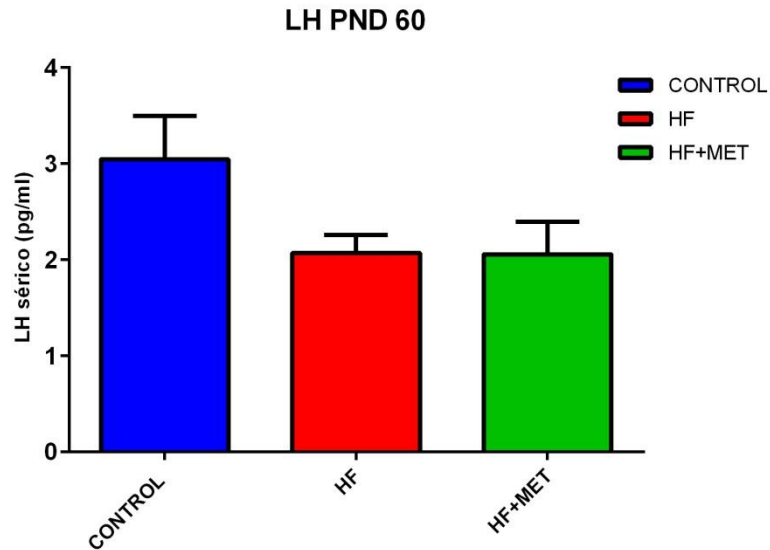


Figura 11. Niveles de hormona luteinizante al PND 60. El gráfico representa los niveles de hormona luteinizante de las crías al PND 60 (n: C=4; HF=3; HF+MET=4). Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM.

La Figura 11 muestra los niveles de hormona luteinizante en plasma para los grupos control, alto en grasa y alto en grasa tratado con metformina. Se observa que las ratas del grupo alto en grasa y alto en grasa tratado con metformina presentan menores niveles de hormona luteinizante que el grupo control.

2. Morfología Ovárica

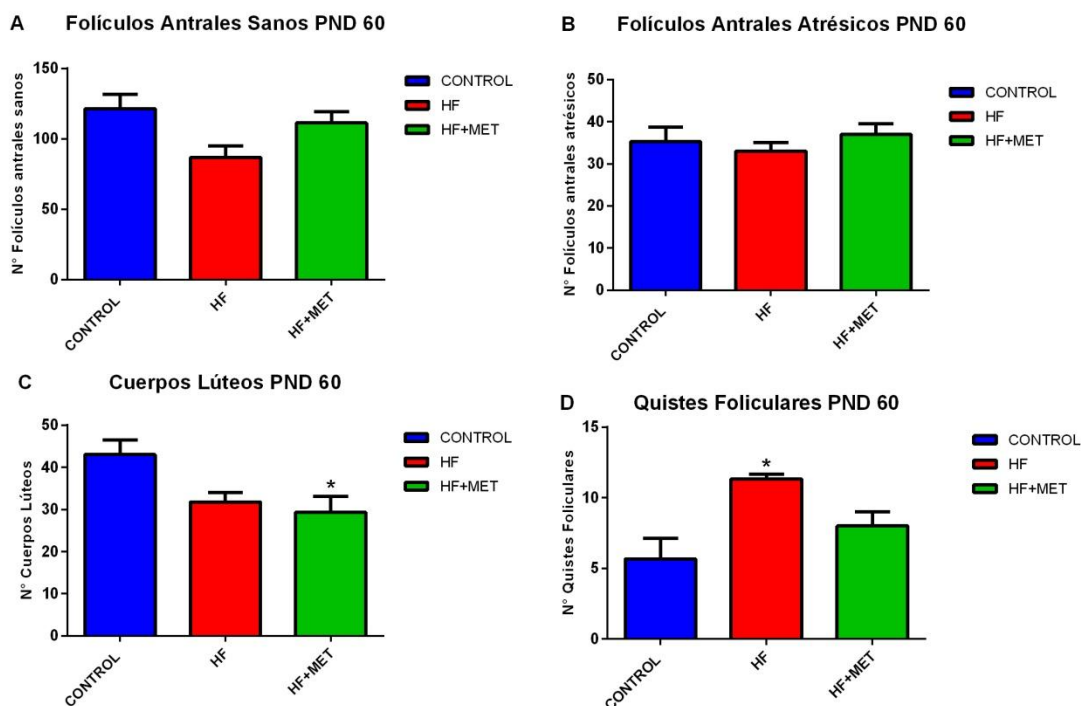


Figura 12. Morfología Ovárica PND 60. A) Número de folículos antrales sanos. El gráfico representa el número de folículos antrales sanos (n: C=3; HF=3; HF+MET=3). B) Número de folículos antrales atrésicos. El gráfico representa el número de folículos antrales atrésicos (n: C=3; HF=4; HF+MET=3). C) Número de cuerpos lúteos. El gráfico representa el número de cuerpos lúteos (n: C=3; HF=4; HF+MET=3). D) Número de quistes foliculares. El gráfico representa el número de quistes ováricos (n: C=3; HF=3; HF+MET=3). Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM. * $p < 0,05$.

La Figura 12A presenta el número de folículos antrales sanos en el día post natal 60 de la descendencia de madres sometidas a una dieta control, dieta alta en grasa y alta en grasa en tratamiento con metformina, donde no es posible apreciar diferencias entre los grupos. La Figura 12B muestra el número de folículos antrales atrésicos en los grupos control, alta en grasa y alta en grasa tratadas con metformina al PND 60. Al igual que en los folículos antrales sanos no hay diferencia entre grupos. La Figura 12C corresponde promedio de cuerpos lúteos observados, los resultados muestran una disminución de cuerpos lúteos en las ratas del grupo alto en grasa tratado con metformina respecto a las ratas control, el grupo HF presenta una clara tendencia a la disminución. La Figura 12D representa el

promedio de quistes foliculares observados en los grupos con dieta control, alto en grasa y alto en grasa tratado con metformina, se observa un aumento del número de quistes foliculares en las crías de ratas madres con obesidad inducida por dieta, el grupo tratado con metformina presenta una tendencia a la disminución de quistes foliculares, no presentando claras diferencias con el grupo control.

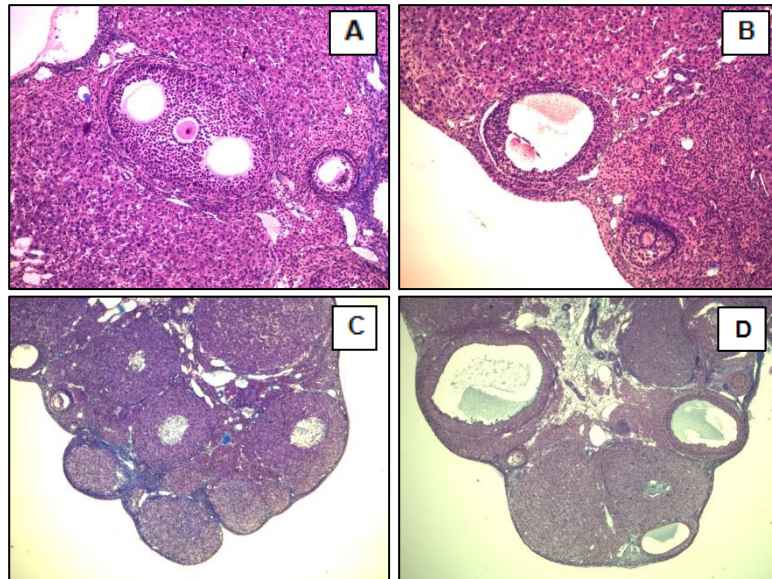


Figura 13. Estructuras morfológicas ováricas. Las imágenes A, B, C y D muestran cortes histológicos de ovario que representan las distintas estructuras foliculares evaluadas en el estudio: folículo antral sano, folículo antral atrésico, cuerpo lúteo y quistes foliculares respectivamente. Los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina-eosina.

La figura 13 representa las estructuras morfológicas ováricas, la imagen A corresponde a un folículo antral sano, la figura B a un folículo antral atrésico, la figura C a un cuerpo lúteo y la figura D a un quiste folicular.

DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio indican que la administración de metformina en agua a madres obesas mejora ciertos parámetros metabólicos y reproductivos de la descendencia de estas ratas, sin embargo, no tiene efecto o incluso empeora otros parámetros. Nuestro laboratorio ha demostrado previamente que la obesidad gestacional inducida por una dieta alta en grasa altera la función hepática y con esto el metabolismo de estradiol en la descendencia, lo que conduce a niveles elevados de estradiol. Los niveles altos de estradiol en la descendencia se relacionan con alteraciones en la función reproductiva, que incluyen pubertad precoz y alteraciones del desarrollo folicular [46]. Este trabajo pretendió evaluar si la administración de metformina a las madres obesas previene las alteraciones observadas en la descendencia.

En cuanto al peso corporal de la descendencia (Figura 1), es posible apreciar que las crías de madres tratadas con dieta HF presentan un mayor peso corporal que la descendencia de madres control desde el nacimiento hasta el periodo de adultez, evidenciado también por el aumento de grasa corporal (Figura 5). Estos datos concuerdan con resultados anteriores obtenidos por nuestro grupo [47]. Jones y cols., describen 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 [48], lo que conduciría a un mayor traspaso de nutrientes desde la madre hacia el feto a través de la barrera placentaria. Ésta condición, junto con la mayor densidad energética del alimento, explicarían el mayor peso observado en las crías del grupo con dieta alta en grasa desde el nacimiento hasta el periodo de destete. Un estudio del año 2011 señala que existe un cambio en la composición de la leche materna en madres

alimentadas con una dieta alta en grasa durante la preñez y lactancia, la cual presenta un mayor porcentaje de grasa y proteínas, con disminución del porcentaje de agua. Este estudio evaluó también el comportamiento materno, en el cual se observa que las madres con dieta alta en grasa pasan más tiempo amamantando a sus crías [49], por lo tanto las crías ingieren una mayor cantidad de leche que sumado a una mayor densidad energética de la leche contribuiría aún más al incremento de peso observado en nuestro modelo. La diferencia de peso entre las crías HF y el grupo control perdura hasta el periodo de adultez, a pesar de que no existe un aumento en la ingesta de alimento (Figura 2), lo que podría sugerir otro mecanismo de balance energético positivo, tal como una disminución de la actividad física. Para comprobar esta hipótesis sería necesario realizar un test de conducta para evaluar éstos parámetros. En la descendencia de madres con dieta alta en grasa sometida a un tratamiento con metformina, se observa un peso similar a las crías HF exceptuando los días post natal 1, 14 y 30 en que su peso fue mayor. Es posible que la administración de metformina durante el periodo de gestación genere cambios a nivel metabólico que induzcan en la descendencia un aumento de peso corporal mayor que el grupo HF en el periodo prepuberal, normalizándose en la adultez. Un estudio en ratones indica que la descendencia femenina expuesta a metformina durante la gestación, las cuales fueron alimentadas con una dieta estándar, presentan mayor peso corporal comparado con el grupo control [50]. Es necesario considerar que la metformina es capaz de atravesar libremente la barrera placentaria [51], pudiendo de ésta manera ejercer sus efectos en el feto. Cabe destacar que si el principal efector de la acción de la metformina está dado por el incremento de los niveles de AMPK (secundario a un aumento de la relación AMP/ATP) se produciría una condición metabólica similar a un estado de desnutrición en el feto. Este

estado podría conducir a cambios a nivel epigenómico, los cuales podrían alterar el metabolismo en la etapa prepuberal debido a una alteración en sensores metabólicos como la AMPK, que pueden llevar a detectar a un ambiente obesogénico como normal [52, 53].

Al analizar el peso hepático (Figura 3), encontramos que al PND 14 no existe una marcada diferencia entre los grupos, pero la descendencia de madres obesas y madres obesas tratadas con metformina, existe una tendencia a presentar mayor peso hepático que la descendencia control. Al llegar al PND 30, es posible apreciar un mayor peso del hígado en el grupo HF. Finalmente, al PND 60, los grupos HF y HF+MET no difieren en el peso hepático respecto al grupo control. A pesar de este resultado, al realizar un análisis de la histología hepática (Figura 4), se evidencia claramente que la descendencia de madres obesas presentan esteatosis representada por la presencia de vesículas lipídicas en los hepatocitos, al igual que en el grupo HF+MET, sin embargo, éstas últimas presentan aparentemente menos vesículas lipídicas. Resultados preliminares de nuestro laboratorio demuestran que al PND 30 existe un mayor porcentaje de grasa hepática en el grupo HF, además de presentar un aumento de las transaminasas glutámico oxalocética (GOT), lo que nos indicaría una disminución de la funcionalidad hepática [54]. Considerando esto, las ratas hijas de madres obesas presentan esteatosis hepática. Al analizar la glucosa plasmática en los distintos grupos (Figura 6A), se evidencia que el grupo HF presenta menores niveles en comparación con el grupo control, lo que podría indicar una alteración en la gluconeogénesis que impida la regulación de la glicemia en ayunas atribuido a la condición de esteatohepatitis. Es importante destacar que el grupo HF+MET presenta valores

similares al grupo control, lo que nos podría indicar que el tratamiento con metformina durante la gestación mejora la funcionalidad hepática de la descendencia.

Se analizó también los niveles de insulina plasmática en los grupos control y HF (Figura 6B), donde éste último presenta hiperinsulinemia. Se realizó el cálculo del índice HOMA-IR (Figura 6C) con la finalidad de determinar la presencia de resistencia a la insulina, en el cual se observa que el grupo HF presenta un mayor valor respecto al grupo control, por lo tanto el grupo HF podría presentar resistencia a la insulina en tejido adiposo y músculo esquelético, generando un aumento de insulina plasmática, produciendo un efecto colateral en otros tejidos que normalmente no están expuestos a niveles elevados de esta hormona, tales como el ovario, donde es capaz de producir hiperandrogenismo [24].

Éste estudio permite confirmar que la descendencia de madres con obesidad inducida por dieta presenta un adelanto de la pubertad evidenciada por la edad de apertura vaginal respecto al grupo control (Figura 7) [47]. Al analizar la edad de inicio de la pubertad en el grupo HF+MET, se observa que aunque los datos se concentran en el rango del grupo HF, éste tampoco presenta diferencias con las crías control, por lo tanto, el tratamiento con metformina podría mejorar parcialmente el adelanto de la apertura vaginal. Al analizar si existe una alteración a nivel de ciclicidad estral (Figura 8), se puede observar que no hay diferencias entre los grupos respecto al número de ciclos estrales.

Diversos estudios indican que los niveles elevados de estradiol pueden producir alteraciones reproductivas como adelanto de la pubertad [29, 30, 55]. Estudios previos en nuestro laboratorio indican que la obesidad materna produce un aumento del estradiol sérico desde el periodo neonatal hasta la adultez [56, 57]. Al evaluar los niveles de estradiol al PND 14

(Figura 9) no es posible encontrar diferencia entre los grupos, pero se aprecia una clara tendencia al aumento de estradiol en el grupo HF, lo que estaría generando el adelanto de la pubertad. En relación al grupo HF+MET se observa una amplia distribución de los datos, lo que podría ser indicador de que el tratamiento con metformina acerca los niveles de estradiol sérico de éste grupo a los niveles presentados por el grupo control, lo anterior se podría definir aumentando el número de crías evaluadas.

Al analizar el estradiol al PND 60, se evidencia que existe un aumento de los niveles séricos de estradiol en el grupo HF (Figura 10), por lo tanto la tendencia al incremento de estradiol al PND 14 se acentúa en la adultez. Resultados en proceso de publicación de nuestro grupo [46] indican que en la descendencia de madres con dieta alta en grasa existe una disminución en el metabolismo del estradiol, representado como una menor abundancia de la enzima CYP3A2 en el grupo HF. El grupo alto en grasa tratado con metformina durante la gestación, presenta una disminución en estos niveles en comparación con el grupo HF, lo que sugiere que el tratamiento con metformina mejora la funcionalidad hepática, reestableciendo posiblemente los niveles de CYP3A2 y normalizando de esta forma los niveles de estradiol.

Los efectos del aumento de estradiol en el grupo HF se ven reflejados en alteración de la folículoogénesis ovárica. En este estudio observamos una tendencia a la disminución en los folículos antrales en ratas hijas de madres obesas y además un menor número de cuerpos lúteos, que son indicadores de un menor desarrollo folicular y un menor número de ovulaciones efectivas, lo que genera una menor probabilidad de fecundación. Sin embargo, los grupos HF y HF+MET presentan niveles similares de LH respecto al grupos control,

por lo que probablemente exista una desregulación a nivel hipotalámico. Se aprecia también un aumento en el número de quistes foliculares en el grupo HF, asemejando al perfil de ovario poliquístico presentado en humanos [2]. El grupo tratado con metformina presenta una tendencia a la disminución de quistes foliculares, no presentando claras diferencias con el grupo control, lo que indicaría una posible mejora de la funcionalidad reproductiva.

Discusión técnica y limitaciones de nuestro estudio

Una limitación de nuestro trabajo corresponde a la menor fertilidad que presentan las ratas sometidas a tratamiento con una dieta alta en grasa. Según nuestros registros un 50% de las ratas obesas tienen una fertilidad exitosa. Al administrar la metformina por vía oral la tasa de fertilidad exitosa fue de un 27%. Queda por determinar si esta disminución en la tasa de fertilidad corresponde a algo circunstancial de nuestro estudio o definitivamente corresponde a un efecto adverso de la metformina, ya que no ha sido reportado por la literatura. Cualquiera sea el caso, esto disminuyó el número de crías que habíamos estimado para nuestro estudio e impidió obtener datos más concluyentes de nuestro trabajo.

Otro de los efectos observados en este estudio (Datos no mostrados) es la disminución del consumo de agua en ratas sometidas a la administración de una dieta alta en grasa. Las ratas que fueron sometidas al tratamiento con dieta alta en grasa y metformina tuvieron una disminución mayor y además con mayor variabilidad en el consumo de agua que las ratas tratadas solo con dieta alta en grasa. Esto lamentablemente no nos permitió tener un control exacto de la dosis de metformina consumida por los animales, ya que ésta dependía de la cantidad de agua que consumían estos. Sin embargo, la dosis promedio de metformina fue

siempre mayor que 100 mg/Kg de rata y en ningún caso fue la que nosotros determinamos inicialmente (250 mg/Kg de rata).

CONCLUSIONES

El tratamiento con metformina en madres con obesidad inducida por dieta alta en grasa revierte parcialmente la pubertad precoz, en la descendencia. También es posible apreciar que en este grupo existe una tendencia a mejorar la folículoogénesis.

El tratamiento con metformina no revierte completamente las alteraciones metabólicas en la descendencia de madres con obesidad inducida por una dieta alta en grasa. Sin embargo, disminuye la esteatosis hepática y normaliza los niveles de glicemia en la descendencia adulta de madres obesas. Además revierte parcialmente el adelanto de la pubertad generado por el aumento de estradiol.

En la descendencia de madres obesas tratadas con metformina se reestablecen los niveles de estradiol sérico al PND 60 respecto a las hijas de madres obesas.

El tratamiento con metformina en madres obesas disminuye el desarrollo de quistes foliculares, pero también la formación de cuerpos lúteos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Salud, O.M.d.I. *Obesidad y Sobrepeso*. 2015; Available from: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/.
2. Vilmann, L.S., et al., *Development of obesity and polycystic ovary syndrome in adolescents*. *Horm Res Paediatr*, 2012. **78**(5-6): p. 269-78.
3. Segula, D., *Complications of obesity in adults: a short review of the literature*. *Malawi Med J*, 2014. **26**(1): p. 20-4.
4. E., A., *Epidemiología de la obesidad en Chile*. *Revista Médica Clínica las Condes*, 2012. **23**(2): p. 117-123.
5. F., M., *Evolución de la antropometría materna y del peso de nacimiento en Chile, 1987-2000*. *Revista Chilena de Nutrición*, 2003. **30**: p. 122-131.
6. Metwally, M., T.C. Li, and W.L. Ledger, *The impact of obesity on female reproductive function*. *Obes Rev*, 2007. **8**(6): p. 515-23.
7. Atalah E., C.R., *Obesidad materna y riesgo reproductivo*. *Revista Médica de Chile*, 2004. **132**: p. 923-930.
8. Tilton, Z., et al., *Complications and outcome of pregnancy in obese women*. *Nutrition*, 1989. **5**(2): p. 95-9.
9. Moore, L.L., et al., *A prospective study of the risk of congenital defects associated with maternal obesity and diabetes mellitus*. *Epidemiology*, 2000. **11**(6): p. 689-94.
10. Watkins, M.L., et al., *Maternal obesity and risk for birth defects*. *Pediatrics*, 2003. **111**(5 Pt 2): p. 1152-8.
11. Lucas, A., *Programming by early nutrition in man*. *Ciba Found Symp*, 1991. **156**: p. 38-50; discussion 50-5.
12. Vieau, D., *Perinatal nutritional programming of health and metabolic adult disease*. *World J Diabetes*, 2011. **2**(9): p. 133-6.
13. Ozanne, S.E., et al., *Early programming of weight gain in mice prevents the induction of obesity by a highly palatable diet*. *Clin Sci (Lond)*, 2004. **106**(2): p. 141-5.
14. Vickers, M.H., et al., *Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2000. **279**(1): p. E83-7.
15. McMillen, I.C., et al., *Regulation of leptin synthesis and secretion before birth: implications for the early programming of adult obesity*. *Reproduction*, 2006. **131**(3): p. 415-27.
16. Samuelsson, A.M., et al., *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): p. 383-92.
17. Strakovsky, R.S., et al., *Gestational high fat diet programs hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and histone modification in neonatal offspring rats*. *J Physiol*, 2011. **589**(Pt 11): p. 2707-17.
18. 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.
19. 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.
20. Chen, H., et al., *Maternal and postnatal overnutrition differentially impact appetite regulators and fuel metabolism*. *Endocrinology*, 2008. **149**(11): p. 5348-56.

21. Ghosh, P., et al., *Abnormal aortic fatty acid composition and small artery function in offspring of rats fed a high fat diet in pregnancy*. J Physiol, 2001. **533**(Pt 3): p. 815-22.
22. Khan, I.Y., et al., *A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005. **288**(1): p. R127-33.
23. Connor, K.L., et al., *Nature, nurture or nutrition? Impact of maternal nutrition on maternal care, offspring development and reproductive function*. J Physiol, 2012. **590**(Pt 9): p. 2167-80.
24. Brill, D.S. and S.M. Moenter, *Androgen receptor antagonism and an insulin sensitizer block the advancement of vaginal opening by high-fat diet in mice*. Biol Reprod, 2009. **81**(6): p. 1093-8.
25. Sloboda, D.M., et al., *Pre- and postnatal nutritional histories influence reproductive maturation and ovarian function in the rat*. PLoS One, 2009. **4**(8): p. e6744.
26. Hilakivi-Clarke, L., et al., *A maternal diet high in n - 6 polyunsaturated fats alters mammary gland development, puberty onset, and breast cancer risk among female rat offspring*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(17): p. 9372-7.
27. Keim, S.A., et al., *Maternal body mass index and daughters' age at menarche*. Epidemiology, 2009. **20**(5): p. 677-81.
28. Ramirez, V.D. and C.H. Sawyer, *Advancement of Puberty in the Female Rat by Estrogen*. Endocrinology, 1965. **76**: p. 1158-68.
29. Sotomayor-Zarate, R., et al., *Neonatal exposure to estradiol valerate programs ovarian sympathetic innervation and follicular development in the adult rat*. Biol Reprod, 2008. **78**(4): p. 673-80.
30. Cruz, G., et al., *Temporal window in which exposure to estradiol permanently modifies ovarian function causing polycystic ovary morphology in rats*. Fertil Steril, 2012. **98**(5): p. 1283-90.
31. Abbott, D.H., V. Padmanabhan, and D.A. Dumesic, *Contributions of androgen and estrogen to fetal programming of ovarian dysfunction*. Reprod Biol Endocrinol, 2006. **4**: p. 17.
32. Ambrosetti V., G.M., *Exposición materna a una dieta alta en grasa previo y durante la preñez y lactancia, y sus consecuencias en la función reproductiva de la descendencia*, in *Facultad de Farmacia*. 2014, Universidad de Valparaíso: Valparaíso, Chile.
33. A., R., *Expresión de cyp3a en el hígado de ratas descendientes de madres con obesidad gestacional y su relación con los niveles séricos de estradiol*, in *Facultad de Farmacia*. 2015, Universidad de Valparaíso: Valparaíso, Chile.
34. A., R., *Expresión ovárica de cyp19 y capacidad ovárica de secreción de estradiol en ratas descendientes de madres obesas en comparación con ratas controles*, in *Facultad de Farmacia*. 2015, Universidad de Valparaíso: Valparaíso, Chile.
35. Aghahosseini, M., et al., *Metformin 2,500 mg/day in the treatment of obese women with polycystic ovary syndrome and its effect on weight, hormones, and lipid profile*. Arch Gynecol Obstet, 2010. **282**(6): p. 691-4.
36. Mkrumian, A.M., et al., *[Efficacy of metformin in abdominal obesity]*. Ter Arkh, 2014. **86**(8): p. 80-4.
37. Inzucchi, S.E., et al., *Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach: position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD)*. Diabetes Care, 2012. **35**(6): p. 1364-79.

38. Rena, G., E.R. Pearson, and K. Sakamoto, *Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights?* Diabetologia, 2013. **56**(9): p. 1898-906.
39. 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.
40. Ainuddin, J.A., et al., *Metformin for preventing gestational diabetes in women with polycystic ovarian syndrome.* J Coll Physicians Surg Pak, 2015. **25**(4): p. 237-41.
41. Glueck, C.J., et al., *Metformin therapy throughout pregnancy reduces the development of gestational diabetes in women with polycystic ovary syndrome.* Fertil Steril, 2002. **77**(3): p. 520-5.
42. Pirwany, I.R., et al., *Effects of the insulin sensitizing drug metformin on ovarian function, follicular growth and ovulation rate in obese women with oligomenorrhoea.* Hum Reprod, 1999. **14**(12): p. 2963-8.
43. Buettner, R., J. Scholmerich, and L.C. Bollheimer, *High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents.* Obesity (Silver Spring), 2007. **15**(4): p. 798-808.
44. Hariri, N. and L. Thibault, *High-fat diet-induced obesity in animal models.* Nutr Res Rev, 2010. **23**(2): p. 270-99.
45. Wilson, R.D. and M.S. Islam, *Fructose-fed streptozotocin-injected rat: an alternative model for type 2 diabetes.* Pharmacol Rep, 2012. **64**(1): p. 129-39.
46. Ambrosetti, V., et al., *Increase in endogenous estradiol in the progeny of obese rats is associated with precocious puberty and altered follicular development in adulthood.* Endocrine, 2015. **In Press.**
47. Ambrosetti, V. and M. Guerra, *EXPOSICIÓN MATERNA A UNA DIETA ALTA EN GRASA PREVIO Y DURANTE LA PREÑEZ Y LACTANCIA, Y SUS CONSECUENCIAS EN LA FUNCIÓN REPRODUCTIVA DE LA DESCENDENCIA.* 2012, Universidad de Valparaíso: Valparaíso. p. 50.
48. Jones, H.N., et al., *High-fat diet before and during pregnancy causes marked up-regulation of placental nutrient transport and fetal overgrowth in C57/BL6 mice.* FASEB J, 2009. **23**(1): p. 271-8.
49. Purcell, R.H., et al., *Maternal stress and high-fat diet effect on maternal behavior, milk composition, and pup ingestive behavior.* Physiol Behav, 2011. **104**(3): p. 474-9.
50. Salomaki, H., et al., *Prenatal metformin exposure in mice programs the metabolic phenotype of the offspring during a high fat diet at adulthood.* PLoS One, 2013. **8**(2): p. e56594.
51. 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.
52. Lizarraga-Mollinedo, E., et al., *Early undernutrition increases glycogen content and reduces the activated forms of GSK3, AMPK, p38 MAPK, and JNK in the cerebral cortex of suckling rats.* J Neurochem, 2010. **112**(1): p. 123-33.
53. Wolfe, D., et al., *Nutrient sensor-mediated programmed nonalcoholic fatty liver disease in low birthweight offspring.* Am J Obstet Gynecol, 2012. **207**(4): p. 308 e1-6.
54. Botros, M. and K.A. Sikaris, *The de ritis ratio: the test of time.* Clin Biochem Rev, 2013. **34**(3): p. 117-30.
55. Sotomayor-Zarate, R., et al., *Neonatal exposure to single doses of estradiol or testosterone programs ovarian follicular development-modified hypothalamic neurotransmitters and causes polycystic ovary during adulthood in the rat.* Fertil Steril, 2011. **96**(6): p. 1490-6.

56. Ramírez, L., *EXPRESIÓN OVÁRICA DE CYP19 Y CAPACIDAD OVÁRICA DE SECRECIÓN DE ESTRADIOL EN RATAS DESCENDIENTES DE MADRES OBESAS EN COMPARACIÓN CON RATAS CONTROLES*. 2014, Universidad de Valparaíso: Valparaíso. p. 47.
57. Reyes, A., *Expresión de cyp3a en el hígado de ratas descendientes de madres con obesidad gestacional y su relación con los niveles séricos de estradiol*. 2014, Universidad de Valparaíso: Valparaíso. p. 27.

ANEXOS

Anexo 1. Acta de Evaluación Bioética



CIBICA
Comité Institucional de Bioética para
la Investigación con Animales

ACTA DE EVALUACIÓN BIOÉTICA 007-2013

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

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

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

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

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


Dr. Sebastián San Martín Henríquez
Presidente



Comité Institucional de Bioética para la Investigación con Animales

SEGUNDO: VALORACION DE ASPECTOS ETICOS

(NC: No corresponde)

1. Los animales recolectados vivos serán utilizados sólo para registro de datos (peso, sexo, lugar de muestreo, etc).	SI	NO	NC
		X	
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	NO	NC
	X		
<p><i>Explique en qué condiciones serán mantenidos y por cuánto tiempo.</i></p> <p>Los animales serán mantenidos con ciclo luz oscuridad de 12 hrs, prendiéndose la luz de manera automática a las 08:00 am y apagándose de igual manera a las 08:00 pm. La T° de esta sala se mantendrá a 22 ± 1 °C. Durante el 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	NO	
	X		
<p><i>Especifique si su respuesta es SI:</i></p> <p>En esta investigación se realizarán cirugías post mortem a ratas para la extracción de los distintos tejidos. Además se administrará mefformina a ratas gestantes.</p>			

4. La práctica clínica considerada en este estudio es invasiva y/o puede potencialmente causar algún grado de malestar, daño físico al animal en estudio, estrés físico, conductual u otro.	SI		NO X	
5. La práctica clínica considerada en este estudio beneficiará directa o indirectamente a los animales del estudio.	SI	NO X	NC	
<i>Especifique si su respuesta es Si.</i>				
6. Señale si los animales obtenidos deben ser sacrificados para la obtención de datos.	SI X		NO	
<i>Justifique el porqué del sacrificio de los animales</i> En este proyecto los animales deben ser sacrificados, debido al interés del investigador responsable en estudiar las distintas hormonas reproductivas en sangre y diversos marcadores moleculares en distintos tejidos.				
<i>Indique el o los métodos eutanasícos que serán utilizados en el estudio</i> En este proyecto se utilizará la decapitación con guillotina. El investigador responsable tiene experiencia en este procedimiento de forma de realizarlo rápidamente y sin infringir estrés o dolor a los animales de experimentación. Esta experiencia proviene de estudios realizados y publicados anteriormente (Cruz et al 2012, Solomayor 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>				

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