



FACULTAD DE FARMACIA

ESCUELA DE NUTRICIÓN Y DIETÉTICA

*Expresión de cyp3a en el hígado de ratas descendientes de madres
con obesidad gestacional y su relación con los niveles séricos de
estradiol*

ALDO REYES CARRASCO

Tesis para optar al título de profesional Nutricionista

Grado académico de Licenciado de Nutrición y Dietética

DIRECTOR: GONZALO CRUZ NECULPÁN PhD

Valparaíso, 2014.

Dedico esta tesis a mi hermosa familia quien siempre ha sido un pilar fundamental en todas las metas que me he propuesto. En especial a mis madres que gracias a su amor incondicional he mirado siempre el futuro como una oportunidad, y veo cada día como una instancia para crecer un poco.

Aldo Reyes Carrasco

Agradecimientos

Agradezco a todo el laboratorio de alteraciones reproductivas y metabólicas de la universidad de Valparaíso, el cual construimos entre todos desde cero con mucho cariño. Donde se rio y rabio pero siempre se sintió un gran calor humano entre todos sus participantes.

Sensei Gonzalo muchas gracias por las oportunidades brindadas y por hacerme ver la ciencia desde otro punto de vista.

Amanda Luchi gracias por los momentos vividos y el apoyo que siempre sentí de tu parte.

Sofía y Daniela de verdad nada esto hubiese sido posible sin ustedes, muchas gracias por su simpatía y ayuda desinteresada.

Valery y Marcelo gracias por guiarme en ese desconocido camino llamado “escribir la tesis”.

Jonathan y Tania gracias por su paciencia y buena disponibilidad para ayudarme en los procedimientos.

Favian y Leo gracias por la buena onda y por compartir conocimientos.

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.
- Agradecemos el apoyo de la Dirección de Investigación de la Universidad de Valparaíso.

Índice

Resumen.....	7
Abstract.....	9
I. Introducción	11
II. Hipótesis	16
III. Objetivo General	16
IV. Objetivos Específicos	16
V. Metodología	17
1) Animales.....	17
2) Caracterización del modelo animal.....	19
3) Determinación de los niveles séricos de Estradiol por Inmuno-ensayo ligado a enzima (ELISA).	19
4) Determinación de expresión de <i>cyp3a</i> por PCR tiempo real.	19
5) Análisis Estadístico.....	20
VI. Resultados:	21
1- Peso corporal durante el desarrollo.....	21
2- Peso hígado durante el desarrollo.	22
3- Niveles de estradiol durante el desarrollo.....	23
4- Expresión de <i>cyp3a</i> en hígado de ratas.....	24
VII. Discusión	26

VIII. Conclusiones 31

Referencias..... 32

Resumen

La obesidad se ha convertido en un serio problema de salud a nivel mundial debido a su estrecha relación con el desarrollo de patologías como diabetes, hipertensión arterial y dislipidemia. La prevalencia de obesidad en mujeres en edad fértil es cada vez mayor, lo cual se ha relacionado directamente con diversos problemas obstétricos y reproductivos. Estudios de nuestro grupo demostraron que los niveles séricos de estradiol en ratas adultas descendientes de madres con obesidad gestacional son más altos que los del grupo control y que esto se relaciona con alteraciones en el desarrollo folicular ovárico. Por otra parte, individuos descendientes de madres con obesidad gestacional tienen características similares a individuos que han sido sometidos a una exposición a estradiol durante etapas vulnerables del desarrollo, entre ellas el desarrollo fetal o etapas neonatales tempranas. De esta forma planteamos que la obesidad previo y durante la gestación incrementa los niveles de estradiol sérico de la descendencia durante el desarrollo posnatal y que esto da cuenta de las alteraciones reproductivas observadas. Ya que CYP3A es una de las enzimas hepáticas encargadas de metabolizar estradiol planteamos que una disminución de la expresión del gen *cyp3a* puede ser el mecanismo que produce los niveles elevados de estradiol durante el desarrollo. Para comprobar esta hipótesis se utilizaron ratas Sprague-dawley divididas en grupos control (C) y tratadas (HFD). Los niveles de estradiol sérico se midieron utilizando la técnica ELISA, mientras que la expresión de *cyp3a* se midió mediante PCR en tiempo real. Los resultados muestran que estradiol se encuentra aumentado significativamente en la descendencia al día 1 postnatal y con una tendencia al aumento a los 14 días posnatal. Los niveles de ARNm de *cyp3a* estuvieron disminuidos en la etapa neonatal temprana (1 y 7

días de vida) y se encontraban en niveles normales desde los 14 días de vida en adelante. En conclusión, una baja expresión de cyp3a podría ser la causa o contribuir al aumento de estradiol sérico en ratas hijas de madres obesas en los primeros días posnatal, sin embargo, queda abierta la posibilidad de buscar otros mecanismos alternativos que lleven al incremento de estradiol en edades más tardías como por ejemplo un incremento en la síntesis de la hormona o una disminución en la metabolización a través de otra vía.

Abstract

Obesity has become a serious health problem worldwide due to its close relationship with the development of pathologies like diabetes, arterial hypertension and dyslipidemia. The prevalence of obesity in women who are in their fertile age has progressively increased, which is directly related to diverse obstetric and reproductive problems. Studies of our group have demonstrated that the serum levels of estradiol in adult rats who were offspring of mothers with maternal obesity were higher than those in the control group. This is related to alterations in the ovarian follicular development. On the other hand, individuals who are descendants of mothers with maternal obesity have similar characteristics with individuals who have been exposed to estradiol during vulnerable stages of their development, among these are the fetal development or early neonatal stages. This way we propose that obesity pre and during gestation increases the serum levels of estradiol of the offspring during their postnatal development and this would be the cause of the observed reproductive alterations. Due to the fact that CYP3A is one of the hepatic enzymes in charge of metabolizing estradiol, we propose that a diminution of the CYP3A gen can be the mechanism that produces the elevated estradiol levels during development. To corroborate this hypothesis, Sprague-Dawley rats were used and divided in groups, control group (C) and treated group (HFD). The serum levels of estradiol were measured by using the ELISA technique, while the amount of CYP3A was measured by polymerase chain reaction (PCR) in real time. The results show that estradiol is found significantly augmented in the offspring at day 1 postnatal and with a tendency to augment at 14 days postnatal. The levels of ARNm of CYP3A were diminished in the early neonatal stage (1

and 7 days of life) and they were found in normal levels from the 14th day of life onwards. In conclusion, a small amount of CYP3A could be the cause or contribute to the augment of serum levels of estradiol in offspring rats from obese mothers in the first postnatal days. However, It remains open the possibility of looking for other alternative mechanisms that increase estradiol in later ages, for instance, an increase in the synthesis of the estradiol hormone or a diminution of the metabolization of it through another way.

I. Introducción

Desde 1980 hasta la actualidad la obesidad se ha duplicado en todo el mundo. La OMS señala que en el 2008, 1400 millones de adultos tenían sobrepeso. Dentro de este grupo, más de 200 millones de hombres y cerca de 300 millones de mujeres eran obesas [1]. De hecho, se ha demostrado que existe una prevalencia de sobrepeso y obesidad cada vez mayor en mujeres en el mundo [2]. En Chile las cifras son bastante desalentadoras, según la encuesta nacional de salud del año 2010 un 64,5% de la población chilena tiene sobrepeso u obesidad, con una mayor prevalencia en mujeres [3]. Debido a esto, más del 50% de las mujeres gestantes que se encuentran en control en el Sistema Nacional de Servicio de la Salud (SNSS) chileno presenta algún grado de sobrepeso u obesidad [4]. Aunque la mayoría de las mujeres obesas no son estériles; la obesidad posee un impacto negativo sobre la fecundidad y la fertilidad que han sido ampliamente documentadas. Por ejemplo: las mujeres obesas tienen tres veces más probabilidades de sufrir infertilidad que las mujeres con un índice de masa corporal normal [5] presentando trastornos de la fecundidad, tanto las mujeres con ciclos reproductivos normales como aquellas sometidas a un tratamiento de fertilización asistida [6, 7]. Por otro lado, el sobrepeso y la obesidad son factores de riesgo bien documentados para el desarrollo de diversas complicaciones obstétricas tales como: diabetes mellitus gestacional [8], aborto involuntario, muerte fetal, macrosomía fetal y nacimiento prematuro [9]. Es más, las madres obesas pueden tener un papel directo en la transmisión transgeneracional de rasgos obesogénicos [10] y diabetogénicos [11]. En esta línea, diversos estudios han informado de que la obesidad gestacional ejerce diversos efectos sobre la descendencia, entre ellos retraso del desarrollo

neurrológico [12], hiperleptinemia [13], hígado graso [14], hipertensión [15], además de macrosomía al nacer lo cual predispone a un mayor riesgo de padecer obesidad y diabetes en la vida adulta [16].

Si bien la incidencia de alteraciones metabólicas de la descendencia de madres obesas se encuentra relativamente bien documentada, existe poca información sobre cómo esto afecta la capacidad reproductiva de la descendencia. Dentro de las evidencias que se encuentran en la literatura, un estudio de seguimiento retrospectivo examinó la relación entre el índice de masa corporal (IMC) de las madres antes del embarazo y el inicio de la pubertad de sus hijas. El estudio encontró una asociación entre el alto IMC materno con una menarquia prematura en las hijas [17]. Tradicionalmente la llegada de la pubertad se ha asociado a una variación en los niveles de estradiol séricos en la etapa prepuberal, tanto en mujeres como en animales de experimentación [18]. Por otra parte, los estudios han demostrado que una exposición fetal a altos niveles de estradiol genera alteraciones a nivel de la función ovárica a largo plazo [19, 20].

El estradiol es una hormona esteroidea que es responsable de buena parte de los cambios que experimentan las niñas al llegar a la pubertad; entre ellos estimula el desarrollo y maduración de órganos sexuales [21], el desarrollo de las mamas y la distribución de la grasa corporal [22]. Debido a esta función multifactorial y diversa del estradiol, una alteración en sus niveles durante el desarrollo puede afectar diversos procesos reproductivos. En el presente estudio pretendemos evaluar la concentración de estradiol en ratas hijas de madres obesas, ya que se ha caracterizado que en este modelo las ratas hijas de madres obesas presentan un adelanto de la pubertad si se comparan con ratas controles [23, 24]. Es importante considerar que en ratas el periodo comprendido entre el día 1 y 7

postnatal corresponde a la etapa neonatal, periodo en que los niveles de estradiol disminuyen luego del nacimiento hasta alrededor del día el día posnatal 14. Este periodo está caracterizado por que las ratas presentan bajos niveles séricos de estradiol. Más adelante los niveles de estradiol comienzan a aumentar durante la etapa prepuberal (cerca a los 30 días postnatal) hasta llegar al umbral necesario para producir la pubertad. Durante la etapa adulta (Sobre los 60 días de edad) los niveles fluctúan en relación al ciclo reproductivo.

Para comprender las fluctuaciones del estradiol en el plasma es fundamental estudiar las vías síntesis y metabolización de esta hormona. El estradiol es sintetizado mayoritariamente en el ovario, específicamente en sus folículos, los que se componen de células de la teca y células de la granulosa. Éstas últimas expresan la enzima aromatasa (CYP19), que se encarga de metabolizar andrógenos provenientes de la teca a estrógenos [25] (figura 1). El control de la función ovárica es llevado a cabo por las hormonas gonadotrópicas hipofisarias (LH, FSH), las cuales a su vez son reguladas por la hormona hipotalámica GnRH [26]. Una vez sintetizado el estradiol, este es transportado en el suero por la proteína SHBG (Sex Hormone Binding Globulin) o ligado a albumina, sin embargo, la fracción metabólicamente activa es la que se encuentra libre en el suero. Los niveles séricos de estradiol dependen de múltiples factores, entre ellos la síntesis ovárica y su eliminación a través del metabolismo hepático. Los principales metabolitos del estradiol son la estrona, el estriol y los catecolestrógenos (2-hidroxiesterona y 2-metoxiesterona [25]). Dentro de las enzimas hepáticas que metabolizan a los estrógenos se encuentra el complejo enzimático citocromo P450 (CYP450). Se ha caracterizado que las isoformas CYP1A2 y CYP3A4 catalizan la 2-hidroxilación, la 4-hidroxilación y la 16 α -hidroxilación tanto de estradiol

como de estrona. Además se ha reportado que una dieta alta en grasa durante la gestación en ratones produce una disminución en la expresión y la actividad de CYP3A2 desde el nacimiento hasta la edad adulta en la descendencia [27]. CYP3A2 en roedores es homólogo a CYP3A4 en humanos [28], y estas enzimas son las responsables del metabolismo hepático de 17- β estradiol [29]. Debido a que estos cambios en la expresión y actividad de CYP3A2 pueden llevar a variaciones en los niveles séricos de 17- β estradiol y por ende de sus efectos durante la vida postnatal, es que nos planteamos evaluar la expresión de *cyp3a* y las concentraciones de estradiol sérico durante el desarrollo.

En resumen, una baja metabolización de estradiol debido a una baja expresión de CYP3A2 en ratas hijas de madres obesas puede llevar a un incremento de la concentración de estradiol durante el desarrollo posnatal. Este aumento de estradiol endógeno, por lo tanto, sería el responsable de parte del fenotipo que presentan las hijas de madres obesas, en el que se observan las alteraciones reproductivas observadas en estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación.

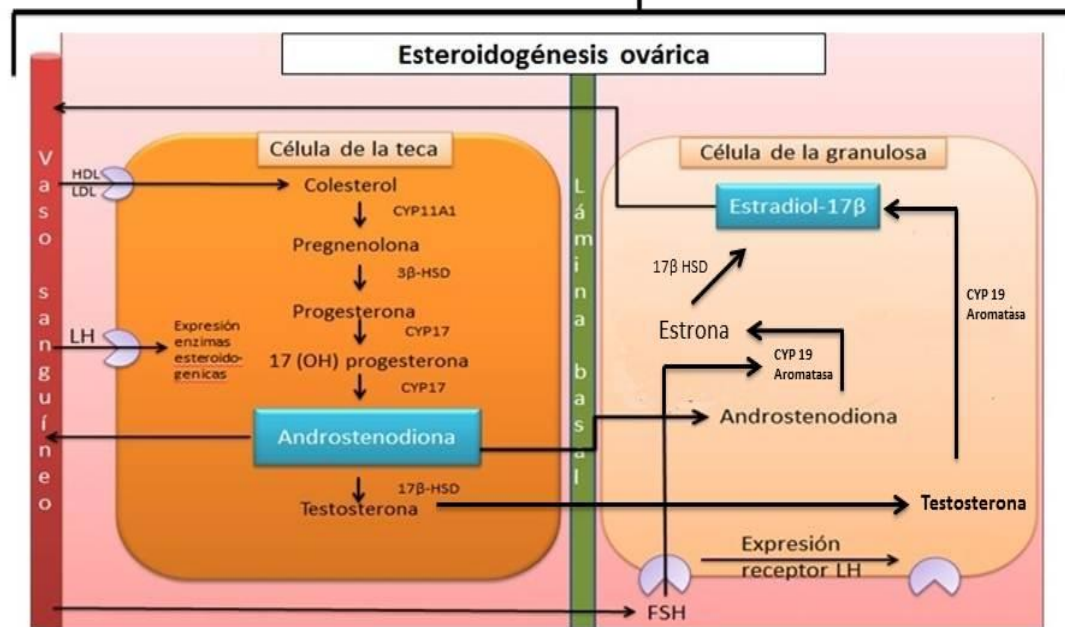
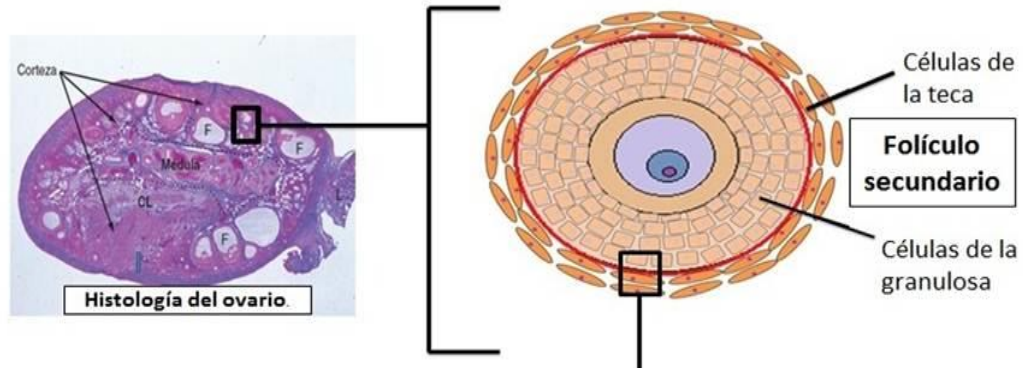


Figura 1: Esteroidogénesis Ovárica. Se muestra la síntesis de esteroides desde su precursor hasta la liberación al torrente sanguíneo. Desde el corte histológico de un ovario se muestra un folículo secundario, en el cual existen 2 tipos de células. En color naranja se esquematiza una célula de la teca, la cual es encargada de producir andrógenos, los cuales pasan a la célula de granulosa (esquematisada en color rosa) donde son metabolizados a estradiol por la enzima aromatasa y posteriormente liberados al torrente sanguíneo.

II. Hipótesis

“La exposición a una dieta alta en grasas previo y durante la gestación en ratas, predispone una disminución de la expresión de *cyp3a* en la descendencia, lo que lleva a un incremento los niveles de estradiol sérico en comparación a ratas control”

III. Objetivo General

Determinar la expresión CYP3a en hígado de ratas descendientes de madres con obesidad gestacional y su relación con los niveles séricos de estradiol.

IV. Objetivos Específicos

- 1) Caracterizar el modelo animal utilizado mediante la medición del peso corporal y el peso del hígado en ratas Sprague-Dawley hijas de madres con obesidad gestacional y de madres control a los 1, 7, 14 y 30 días de edad.
- 2) Medir la expresión de CYP3a mediante PCR en tiempo real en ratas Sprague-dawley hijas de madres con obesidad gestacional y de madres control a los 1, 7, 14, 30 y 60 días de edad.
- 3) Determinar los niveles de estradiol sérico mediante test de ELISA en ratas Sprague-dawley hijas de madres con obesidad gestacional y de madres control a los 1, 7, 14 días de edad.

V. Metodología

1) Animales

En esta tesis se utilizaron ratas de la cepa Sprague-dawley de entre 200 y 250g de peso. Los animales fueron separados en dos grupos experimentales: ratas con dieta control (Dieta Champion: 20% Proteína, 55% Hidratos de Carbono, 5% Lípidos, 4% Fibra y 6% Cenizas, equivalentes a 3,49 Kcal/g) y ratas con dieta alta en grasa (High Fat: HF, Research Diet™ USA; 20% Proteína, 20% Hidratos de Carbono y 60% Lípidos, equivalentes a 5,24 Kcal/g). Los animales tuvieron acceso a agua y comida *ad libitum* y fueron mantenidos en una sala con temperatura controlada y con un ciclo día noche de 12:12 horas. Los animales permanecieron durante 6 semanas en el bioterio de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso. Las 3 primeras semanas se controló el peso corporal y la ciclicidad estral y ambos grupos fueron expuestos a dieta control. Las siguientes 4 semanas se mantuvieron con una dieta control o HF según corresponda. Al finalizar las 4 semanas se dejaron las hembras con un macho reproductor en la tarde de la etapa proestro del ciclo estral. La confirmación de la preñez se realizó mediante frotis vaginal evaluando la presencia de espermatozoides al día siguiente (Etapa Estro). Las ratas cuya preñez fue exitosa permanecieron con su dieta original (control o HF) durante el periodo de gestación y fueron sacrificadas mediante decapitación al momento del destete. Las crías se sacrificaron mediante decapitación los días 1, 7, 14 y 30 de edad. Al momento de la eutanasia se extrajeron los ovarios, hígado y suero para posteriormente hacer los análisis. 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).

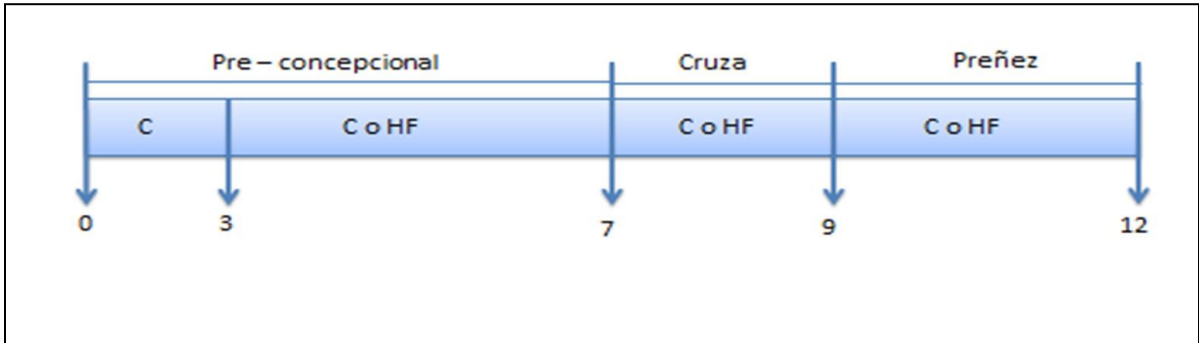


Figura 2: Diseño experimental ratas madres. Durante 3 semanas las ratas se mantuvieron con comida control. Luego de esto se separaron en 2 grupos donde se les dio comida control (c) y alta en grasa (HF), al cabo de 4 semanas con sus respectivas dietas se cruzaron por un periodo máximo de 2 semanas y finalmente se mantuvieron con su dieta respectiva durante la preñez.

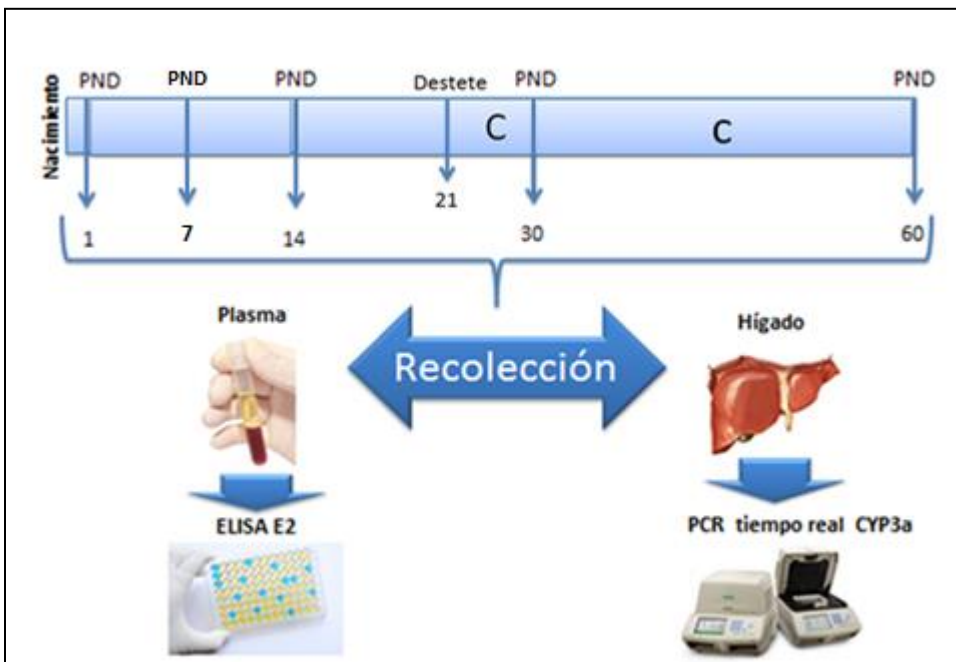


Figura 3: Diseño experimental de la descendencia. Durante el día postnatal 1 ,7 y 14 se sacrificaron ratas hembras las cuales estaban con lactancia materna, donde las madres siguen con su respectiva dieta, ya sea esta control o HF. Luego del destete todas las crías se mantuvieron con dieta control y al día posnatal 30 y 60 se sacrificaron hembras. A todas las ratas se les extrajeron muestras de suero e hígado para realizar los respectivos Test de ELISA y PCR tiempo real.

2) Caracterización del modelo animal

Las crías fueron pesadas diariamente desde su nacimiento hasta el día posnatal 60. Se pesaron todos los animales previos a la eutanasia y se pesó el hígado de cada animal. El peso corporal se midió utilizando una balanza granataria digital con una sensibilidad de 0,1g y el peso del hígado se midió utilizando una balanza analítica digital con una sensibilidad de 0.0001g.

3) Determinación de los niveles séricos de Estradiol por Inmuno-ensayo ligado a enzima (ELISA).

Se realizó la determinación de Estradiol a todas las crías mediante el análisis de una muestra de suero obtenida durante la eutanasia a los días 1, 7, 14 y 30 de edad. Los niveles de Estradiol (E_2) se determinaron por ELISA competitivo de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Alpco Diagnostic, USA). Este cuenta con una sensibilidad de 10 pg/ml y una especificidad del 100% para estradiol.

4) Determinación de expresión de *cyp3a* por PCR tiempo real.

La extracción de ARN total se realizó con el kit RNeasy® Mini Kit (QUIAGEN, Cat. No. 74104). Para la transcripción reversa se utilizó la enzima SuperScript II (Invitrogen, Cat. 18064-014), random primers (Invitrogen, Cat. 48190-011) e inhibidor de RNAasa (RNase OUT, Invitrogen, Cat. 10777-019). El cDNA obtenido de la transcripción reversa se amplificó por PCR en tiempo real utilizando los siguientes partidores para *cyp3A*: Forward: 5' – CCAGCAGCACACTTTCCTTTG –3' y Reverse: 5'-GGTGGGAGGTGCCTTATTGG-3'. Se realizó una curva de calibrado en la cual el Ct es inversamente proporcional a la concentración del producto amplificado. Los datos fueron

normalizados por el gen constitutivo 18s cuyos primers son: Forward: 5' – TCA AGA ACG AAA GTC GGA GG – 3' y Reverse: 5' – GGA CAT CTA AGG GCA TCA CA – 3'.

5) Análisis Estadístico.

En los estudios en animales de experimentación debe existir un equilibrio entre el aspecto estadístico y el bioético para determinar el número de muestra adecuado, considerando que todos los animales son sometidos a eutanasia al final del estudio. Los animales de experimentación presentan una variabilidad muy baja con respecto al humano, ya que se encuentran en condiciones controladas, por lo que un “n” entre 4 y 8 animales por grupo es un valor adecuado, según lo evidenciado en distintos trabajos publicados en el área. Sin embargo, en esta tesis el “n” también depende de la cantidad de crías que tienen las madres, ya que se hacen los análisis con la descendencia.

Los datos se analizaron mediante el programa GraphPad Prism® versión 5.01. Los resultados se expresaron como el promedio \pm el error estándar medio (SEM), y se analizaron mediante la prueba de comparación de medias T-student. Se estableció * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ para indicar diferencias estadísticamente significativas.

VI. Resultados:

1- Peso corporal durante el desarrollo

Durante el periodo de lactancia cada madre se mantuvo con su dieta respectiva, donde al analizar los pesos de su descendencia (fig. 4) se arrojó que al día post natal 1 el peso de la descendencia HF fue mayor que el del grupo control ($p < 0.001$ control n:54 v/s HF n:70) . Resultados similares se observaron durante los días post natal 7 ($p < 0.0001$ control n:87 v/s HF n:59), 14 ($p < 0.0001$ control n:77 v/s HF n:62) y 30($p < 0.0001$ control n:47 v/s HF n:24) .

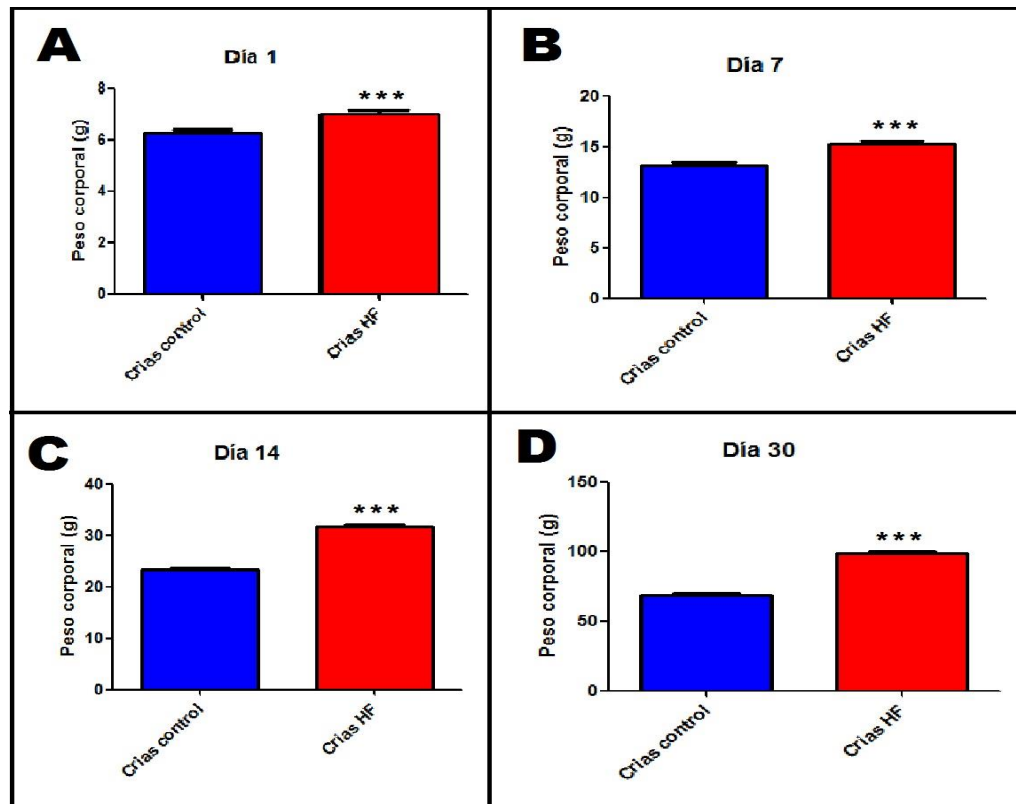
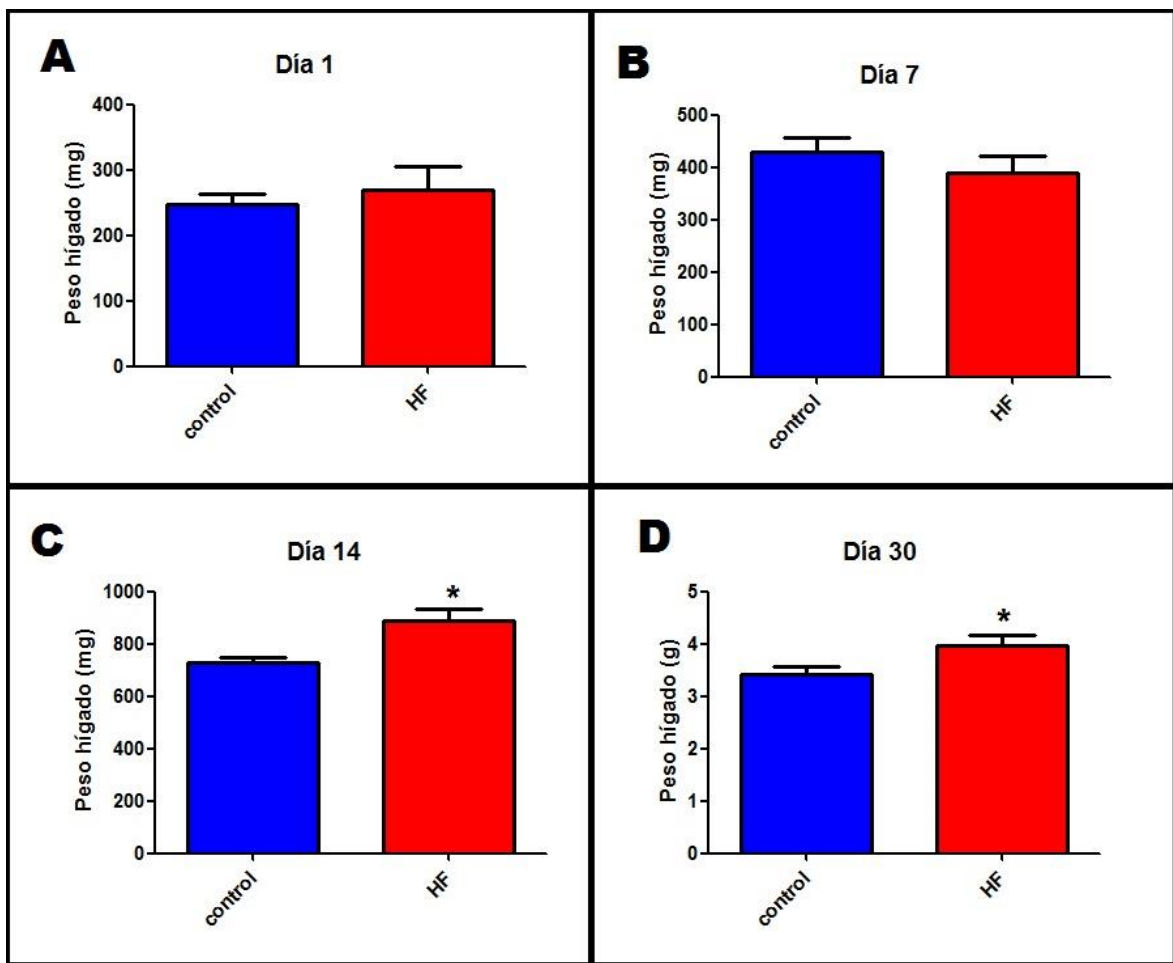


Figura 4: Peso corporal de la descendencia hasta la adolescencia. Se observa en azul el grupo descendiente de madres alimentadas con una dieta control y en rojo a la descendencia alimentada con una dieta alta en grasas (HF). (A) Peso al día postnatal 1. (B) Peso al día postnatal 7. (C) Peso al día postnatal 14. (D) Peso al día postnatal 30. Los resultados se expresan en el promedio \pm SEM. *** $p < 0.0001$ vs Control.

2- Peso hígado durante el desarrollo.

Se determinó el peso de los hígados al momento de ser estos extraídos y se evidenció que durante los primeros días vida: día postnatal 1 (n=9 grupo control v/S n=3 grupo HF) y día postnatal 7 (n=3 grupo control V/S n=3 grupo HF) no hubo diferencia entre los grupos controles y tratados. Sin embargo desde el día postnatal 14 ($p < 0.05$; n=4 V/S n=6) y el día postnatal 30 ($p < 0.05$; n=10 grupo control V/S n=7 grupo HF) comienzan a existir diferencias significativas en el peso de este órgano entre ambos grupos. Este efecto es aún mayor al día postnatal 60 ($p < 0.0001$; n=10 grupo control V/S n=6 grupo HF)



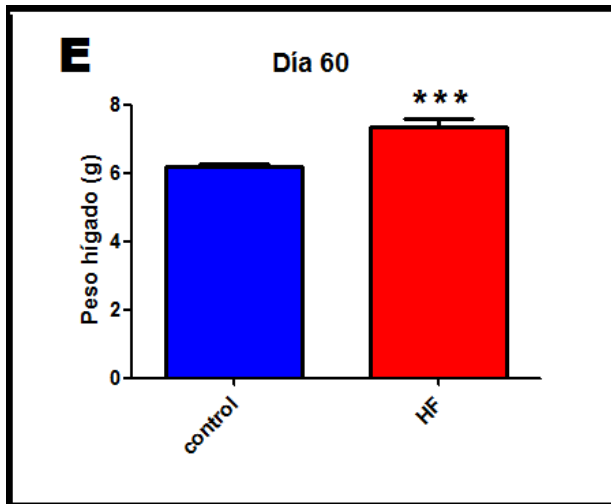


Figura 6 Peso de hígado durante el desarrollo. En barras azules se representa el peso del hígado de la descendencia de madres alimentadas con una dieta control y en barras azules se representa el peso de hígado de la descendencia de madres alimentadas con una dieta alta en grasas. (A) Peso de hígado al día postnatal 1. (B) Peso de hígados al día postnatal 7. (C) Peso de hígados al día postnatal 14. (D) Peso de hígados al día postnatal 30. (E) Peso de hígados al día postnatal 60. Los resultados se expresan en el promedio \pm SEM. * $p < 0.05$ *** $p < 0.0001$ vs Control.

3- Niveles de estradiol durante el desarrollo

Ya que evidencias diversas sugieren que hijas de madres obesas podrían estar sometidas a un ambiente hiperestrogénico, se determinaron niveles estradiol sérico durante las etapas neonatal e infantil de la descendencia de madres obesas y controles (Fig. 5 A). Durante el día postnatal 1 se encontró un aumento de esta hormona para el grupo HF ($p < 0.05$; $n=8$ grupo control vs $n=4$ grupo HF). El caso del día postnatal 14 (Fig. 5B), se obtuvieron resultados similares donde la concentración sérica de estradiol para el grupo HF era mayor en comparación con el control ($n=6$ grupo control vs $n=6$ grupo HF).

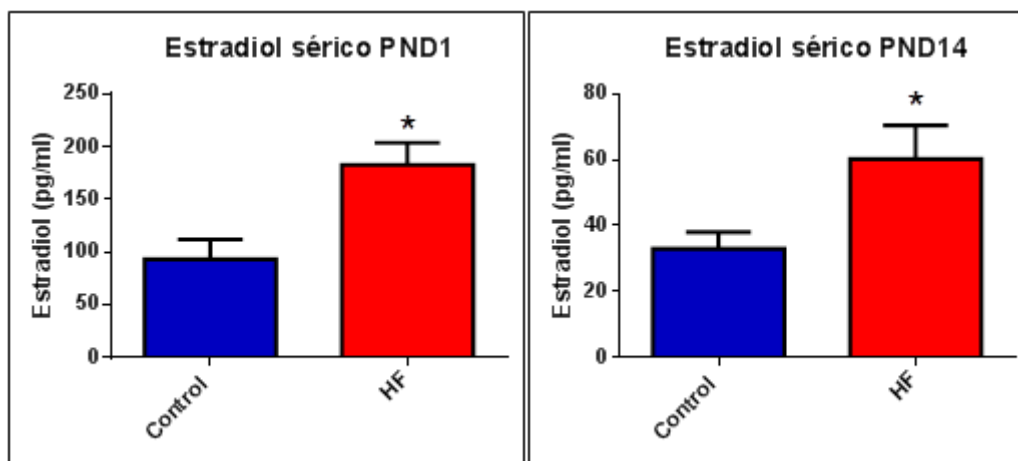


Figura 5: Niveles séricos de estradiol. Las barras en color azul pertenecen a los niveles séricos de estradiol de la descendencia de madres alimentadas con una dieta control y las barras de color rojo pertenecen a los niveles séricos de estradiol de la descendencia de madres alimentadas con una dieta alta en grasa (A) Estradiol sérico al día postnatal 1 (pg/mL). (B) Estradiol sérico al día postnatal 14 (pg/mL). Los resultados se expresan en el promedio \pm SEM. * $p < 0.05$ vs Control.

4- Expresión de *cyp3a* en hígado de ratas

Una importante vía de metabolización de estradiol corresponde al citocromo CYP3A hepático y pensamos que su expresión puede estar disminuida en el grupo HF. Se ha determinado la expresión de *cyp3a* desde la edad neonatal hasta la edad adulta (fig. 7). Los resultados muestran que al día postnatal 1 (fig. 7A) hubo diferencias significativas entre el grupo control y HF ($p < 0.05$ control n: 3 v/s HF n: 4), donde este se encontraba disminuido en el grupo HF, algo similar ocurrió en el día postnatal 7 (fig. 7B) donde también hubo diferencias significativas entre ambos grupos en la expresión de este mRNA ($p < 0.05$ control n: 4 v/s HF n: 4). Sin embargo al día postnatal 14 (fig. 7C) no hubo diferencias entre ambos grupos (control n: 4 y HF n: 6). Resultados similares se observaron durante el día postnatal 30 (fig. 7D) (control n: 6 v/s HF n: 7) y día postnatal 60 o adultez (fig. 7E) (control n: 10 v/s HF n: 6).

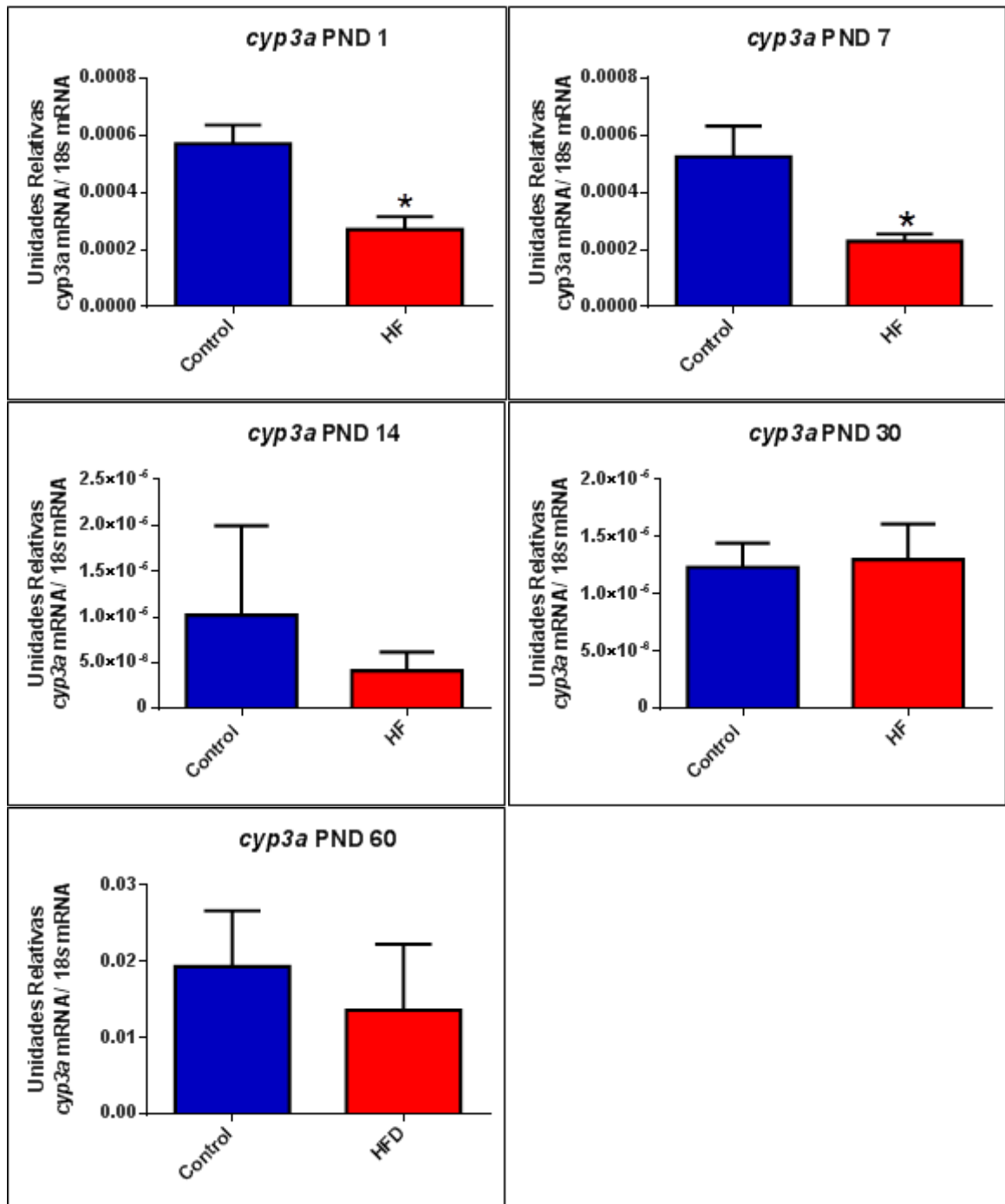


Figura 7: Expresión de *cyp3a* en hígado de ratas durante etapas de la vida postnatal hasta la adultez. En barras azules se representan la expresión de *cyp3a* en hígado de ratas descendientes de madres alimentadas con una dieta control, por otro lado en barras rojas se representa la expresión de *cyp3a* en ratas descendientes de madres con obesidad gestacional (A) Expresión de *cyp3a* al día postnatal 1 (B) Expresión de *cyp3a* al día postnatal 7 (C): Expresión de *cyp3a* al día postnatal 14. (D) Expresión de *cyp3a* al día postnatal 30. (E) Expresión de *cyp3a* al día postnatal 60. . Los resultados se expresan en el promedio \pm SEM. * $p < 0.05$ v/s Control.

VII. Discusión

Diversos estudios han demostrado el impacto de la obesidad materna previo y durante la gestación sobre la función cardiovascular y metabólica en la descendencia[30]. Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que la obesidad inducida por la exposición a una dieta alta en grasa durante la gestación incrementa los niveles de estradiol sérico en la descendencia durante el desarrollo posnatal. Esto puede explicar las alteraciones ováricas y reproductivas observadas durante la adultez en este modelo experimental tanto por nuestro grupo como por otros autores.

Caracterización del modelo experimental en la descendencia

En el presente estudio observamos que las ratas hijas de madres obesas presentaron un aumento en el peso corporal al nacer con respecto al grupo control. Strakovsky [31] y Ashino [32] previamente habían demostrado que la obesidad gestacional era un factor que predisponía a la descendencia a tener mayor peso al momento del nacimiento. En nuestro estudio este aumento de peso se mantuvo durante la adolescencia y perduró hasta la adultez. Se han realizado estudios en otros modelos experimentales como ratas [33] y ovejas [34], en donde se han demostrado resultados similares a nuestro estudio. Además, se ha descrito que mientras mayor es el IMC de la madre durante el embarazo, mayor es la probabilidad de que la descendencia sea macrosómica al momento del nacimiento y mayor es la posibilidad de padecer obesidad durante la vida adulta [35]. En este estudio el aumento de peso al nacer probablemente se deba a un exceso de grasa en corporal producto a una hipertofia de los adipocitos, como se ha reportado en diversos estudios [36, 37]. Esto

no fue comprobado en nuestra serie experimental, sólo es sugerido en base a la percepción visual de la grasa abdominal de los animales al momento de la eutanasia, ya que no se cuantifico la grasa corporal. Respecto al peso hepático durante los primeros días de vida no hubo diferencias entre las ratas controles y HF al día 1 y 7 postnatal, pero luego del día 14 postnatal el peso del hígado fue mayor en ratas HF, efecto conservado en la adultez. La hepatomegalia es un signo característico del hígado graso y cursa con una disfunción del hígado en diversas funciones [38]. En un estudio realizado en humanos se indagó en el contenido lipídico del hígado de hijos de madres con peso normal y madres obesas con diabetes gestacional [39]. En este estudio se demostró que los bebés nacidos de madres obesas con diabetes gestacional tuvieron un aumento promedio del 68% en el contenido graso hepático en comparación con los niños nacidos de madres con peso normal [39]. Resultados similares obtuvo Neena Modi [40] en un estudio realizado también en humanos, en el que demostró un aumento del contenido graso del hígado junto a un aumento de la adiposidad abdominal en la descendencia de madres obesas. Aun no se conoce el mecanismo por el cual el sobrepeso u obesidad de la madre podría estar afectando estos parámetros en su descendencia, sin embargo, se ha documentado que altos niveles de glucosa plasmática favorecen el aumento de grasa corporal y hepática, ya que este nutriente se transfiere al feto por un gradiente positivo desde la madre a través de la placenta. Por otra parte, se ha relacionado la obesidad materna con un deterioro de la placenta [41], lo cual podría estar influyendo en la entrega de nutrientes y energía al feto.

Niveles séricos de estradiol y su relación con los niveles de CYP3A en ratas descendientes de madres obesas comparadas con controles.

La hepatomegalia con acumulación grasa es un factor importante a considerar en el desarrollo de la descendencia de madres obesas. Una menor función hepática podría potencialmente incrementar los niveles séricos de diversas sustancias que son metabolizadas en el hígado. Dentro de las sustancias metabolizadas en hígado se encuentran los estrógenos. Los niveles de estradiol sérico en el grupo HF se encontraban aumentados significativamente el día 1 postnatal y 14. Lamentablemente, por motivos experimentales no pudimos medir los niveles de estradiol a los 7 días de edad. Evidencias de nuestro grupo [42] indican que los niveles elevados de estradiol se mantienen hasta los 30 y 60 días de edad.

Los niveles de estradiol elevados durante el desarrollo posnatal pueden causar varias alteraciones reproductivas, entre ellas una pubertad precoz y ovario poliquístico en la adultez. Modelos experimentales en que se inyecta estradiol durante la vida posnatal temprana también generan una morfología ovárica alterada [43]. Nuestro grupo de investigación [24] y otros grupos [23] han observado alteraciones reproductivas similares en el modelo de obesidad gestacional. En el presente trabajo hemos evidenciado que las alteraciones reproductivas producidas en la descendencia pueden ser producto de niveles elevados de estradiol endógeno. Con respecto al mecanismo que lleva al incremento de estradiol endógeno, nuestra hipótesis es que la alteración hepática de la descendencia disminuye la metabolización de estradiol. Por esta razón determinamos la expresión del gen de la enzima *cyp3a* por PCR en tiempo real. Los resultados muestran que no existe una

disminución en niveles del ARNm de *CYP3a* a los 14 y 30 días de edad, sin embargo, al día 1 de edad y a los 7 días encontramos una disminución de los niveles. En un estudio realizado por Tajima [27] con un modelo de obesidad gestacional en ratones, demostró que la expresión de la enzima CYP3A de los recién nacidos (0 semanas) en el grupo HF fue significativamente menor que en el grupo de control. Una disminución similar en el nivel de expresión de esta enzima CYP3A en el grupo HF también se observó a las 3, 6, y 12 semanas de edad en este estudio. Por otro lado, un estudio realizado en primates que evaluó la expresión de un citocromo P4501A1, demostró que este disminuye en el grupo descendiente de madres obesas [44]. Aunque es importante para la continuación de este trabajo determinar la actividad y/o nivel proteico del citocromo, podemos inferir que las ratas hijas de madres obesas presentan una alteración morfológica y funcional hepática, en que se observa una disminución de la expresión del citocromo *cyp3a*, lo que potencialmente es un mecanismo que lleva al aumento de estradiol en hijas de madres obesas.

En el presente estudio planteamos un posible mecanismo por el cual se producen las alteraciones reproductivas en la descendencia femenina de madres con obesidad gestacional. Demostramos que los niveles de estradiol se encuentran aumentados en la descendencia de ratas sometidas a una alimentación con una dieta alta en grasa durante la preñez y planteamos una disminución de la expresión de *cyp3a* como un posible mecanismo del aumento de esta hormona. Los nuevos desafíos en esta investigación serán ahondar en los mecanismos por los cuales se producen dichas alteraciones y plantear medidas terapéuticas para prevenir estas consecuencias de la obesidad durante la gestación. De esta forma podemos contribuir a mejorar el entendimiento de las alteraciones a largo plazo producidas por la obesidad gestacional y podemos dar las bases científicas para

generar políticas de salud publicas enfocadas en el la prevención de dichas alteraciones más que en políticas enfocadas en medidas paliativas, las cuales han demostrado ser poco efectivas de acuerdo al perfil epidemiológico del país.

VIII. Conclusiones

- 1) Las ratas hijas de madres con obesidad gestacional presentan un mayor peso desde el día postnatal 1 de vida hasta el día 30. Donde no hay diferencias en el peso del hígado durante los días postnatales 1 y 7, sin embargo desde el día postnatal 14, 30 y 60 el peso de la descendencia de madres con obesidad gestacional es mayor en comparación al grupo control.
- 2) Los niveles del ARNm de cyp3a en el hígado de ratas hijas de madres obesas se encuentran disminuidos en los días 1 y 7 de edad, con una tendencia a la disminución en el día 14 de edad y sin cambios a los 30 y 60 días de edad comparado con ratas controles.
- 3) Los niveles de estradiol sérico se encuentran aumentados el día 1 de vida, con una tendencia al aumento en el día 14 de vida, y no pudo ser cuantificado al día 7 de vida.

Referencias

1. OMS. *obesidad y sobrepeso* 2013; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>.
2. Lewis, V. and K. Hoeger, *Prevention of coronary heart disease: a nonhormonal approach*. Semin Reprod Med, 2005. **23**(2): p. 157-66.
3. MINSAL, *Encuesta Nacional de Salud, Chile*. 2009-2010: p. 29.
4. S., A., *EPIDEMIOLOGY OF OBESITY IN CHILE*. REV. MED. CLIN. CONDES 2012.
5. Rich-Edwards, J.W., et al., *Adolescent body mass index and infertility caused by ovulatory disorder*. Am J Obstet Gynecol, 1994. **171**(1): p. 171-7.
6. Zaadstra, B.M., et al., *Fat and female fecundity: prospective study of effect of body fat distribution on conception rates*. BMJ, 1993. **306**(6876): p. 484-7.
7. Crosignani, P.G. and D.E. Walters, *Clinical pregnancy and male subfertility; the ESHRE multicentre trial on the treatment of male subfertility*. European Society of Human Reproduction and Embryology. Hum Reprod, 1994. **9**(6): p. 1112-8.
8. Baptiste-Roberts, K., et al., *Gestational diabetes and subsequent growth patterns of offspring: the National Collaborative Perinatal Project*. Matern Child Health J, 2012. **16**(1): p. 125-32.
9. Metwally, M., W.L. Ledger, and T.C. Li, *Reproductive endocrinology and clinical aspects of obesity in women*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1127**: p. 140-6.
10. Catalano, P.M. and H.M. Ehrenberg, *The short- and long-term implications of maternal obesity on the mother and her offspring*. BJOG, 2006. **113**(10): p. 1126-33.
11. King, V., et al., *Maternal obesity has little effect on the immediate offspring but impacts on the next generation*. Endocrinology, 2013. **154**(7): p. 2514-24.
12. Paulson, J.F., et al., *Large for gestational age and long-term cognitive function*. Am J Obstet Gynecol, 2014. **210**(4): p. 343 e1-4.
13. Bouret, S.G., *Early life origins of obesity: role of hypothalamic programming*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2009. **48 Suppl 1**: p. S31-8.
14. Gregorio, B.M., et al., *Maternal high-fat intake predisposes nonalcoholic fatty liver disease in C57BL/6 offspring*. Am J Obstet Gynecol, 2010. **203**(5): p. 495 e1-8.
15. Oken, E., et al., *Associations of gestational weight gain with short- and longer-term maternal and child health outcomes*. Am J Epidemiol, 2009. **170**(2): p. 173-80.
16. Chen, P., et al., *Weight estimation for low birth weight fetuses and macrosomic fetuses in Chinese population*. Arch Gynecol Obstet, 2011. **284**(3): p. 599-606.
17. Keim, S.A., et al., *Maternal body mass index and daughters' age at menarche*. Epidemiology, 2009. **20**(5): p. 677-81.
18. 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.
19. 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.
20. Padmanabhan, V., et al., *Developmental reprogramming of reproductive and metabolic dysfunction in sheep: native steroids vs. environmental steroid receptor modulators*. Int J Androl, 2010. **33**(2): p. 394-404.
21. Boyar, R.M., et al., *Human puberty: 24-hour estradiol in pubertal girls*. J Clin Endocrinol Metab, 1976. **43**(6): p. 1418-21.

22. Marshall, W.A. and J.M. Tanner, *Variations in pattern of pubertal changes in girls*. Arch Dis Child, 1969. **44**(235): p. 291-303.
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. 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.
25. Levy, B.y., *Fisiología*. sexta ed. Sección VIII: Sistema Endocrino y Aparato Reproductor, Los aparatos reproductores femenino y masculino. 2009.
26. Hall, G.y., *Tratado de fisiología médica* decimo segunda ed. Unidad XIV: Endocrinología y reproducción. Capitulo 81: Fisiología femenina antes del embarazo y hormonas femeninas. 2011.
27. Tajima, M., et al., *Consumption of a high-fat diet during pregnancy decreases the activity of cytochrome P450 3a in the livers of offspring*. Eur J Pharm Sci, 2012. **47**(1): p. 108-16.
28. Martignoni, M., G.M. Groothuis, and R. de Kanter, *Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2006. **2**(6): p. 875-94.
29. Yu, A.M., et al., *Potential role for human cytochrome P450 3A4 in estradiol homeostasis*. Endocrinology, 2005. **146**(7): p. 2911-9.
30. Dong, M., et al., *Maternal obesity, lipotoxicity and cardiovascular diseases in offspring*. J Mol Cell Cardiol, 2013. **55**: p. 111-6.
31. 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.
32. 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.
33. Franco, J.G., et al., *Maternal high-fat diet induces obesity and adrenal and thyroid dysfunction in male rat offspring at weaning*. J Physiol, 2012. **590**(Pt 21): p. 5503-18.
34. Long, N.M., et al., *Maternal obesity and increased nutrient intake before and during gestation in the ewe results in altered growth, adiposity, and glucose tolerance in adult offspring*. J Anim Sci, 2010. **88**(11): p. 3546-53.
35. Nathanielsz, P.W., L. Poston, and P.D. Taylor, *In utero exposure to maternal obesity and diabetes: animal models that identify and characterize implications for future health*. Clin Perinatol, 2007. **34**(4): p. 515-26, v.
36. Muhlhausler, B. and S.R. Smith, *Early-life origins of metabolic dysfunction: role of the adipocyte*. Trends Endocrinol Metab, 2009. **20**(2): p. 51-7.
37. Poston, L., *Maternal obesity, gestational weight gain and diet as determinants of offspring long term health*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2012. **26**(5): p. 627-39.
38. Gaiani, S., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in nonobese patients with diabetes: Prevalence and relationships with hemodynamic alterations detected with Doppler sonography()*. J Ultrasound, 2009. **12**(1): p. 1-5.
39. Brumbaugh, D.E., et al., *Intrahepatic fat is increased in the neonatal offspring of obese women with gestational diabetes*. J Pediatr, 2013. **162**(5): p. 930-6 e1.

40. Modi, N., et al., *The influence of maternal body mass index on infant adiposity and hepatic lipid content*. *Pediatr Res*, 2011. **70**(3): p. 287-91.
41. Farley, D., et al., *Feto-placental adaptations to maternal obesity in the baboon*. *Placenta*, 2009. **30**(9): p. 752-60.
42. Ramírez LA, A.V., Guerra M, Reyes A, Álvarez D, Olgún S, Cerda T, Cruz G. , *Sexual hormones and aromatase expression in the offspring of rats submitted to a high fat diet previous and during pregnancy*, in *Laboratorio de Alteraciones Reproductivas y Metabólicas. CNPC. Instituto de Fisiología, Facultad de Ciencias*. 2014, Universidad de Valparaíso.
43. Cruz, G., *Temporal window in which exposure to estradiol permanently modifies ovarian function causing polycystic ovary morphology in rats*. *Fertil Steril*, 2012. **98**: p. 1283-90.
44. DuBois, B.N., et al., *Maternal obesity alters feto-placental cytochrome P4501A1 activity*. *Placenta*, 2012. **33**(12): p. 1045-51.