



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

# **Metformina y fertilidad femenina: efectos en condiciones fisiológicas y patológicas provocadas por una dieta alta en grasas**

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la  
Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

**Lic. Candela Velazquez**

Directora de tesis: Dra. Dalhia Abramovich

Directora adjunta: Dra. Fernanda Parborell

Consejera de Estudios: Dra. Cecilia Varone

Lugar de trabajo: Instituto de Biología y Medicina experimental (IByME)  
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Buenos aires, 2025

# **Metformina y fertilidad femenina: efectos en condiciones fisiológicas y patológicas provocadas por una dieta alta en grasas**

## **RESUMEN**

Este estudio aborda dos aspectos del hipoglucemiantre metformina:

- I) Sus efectos en condiciones fisiológicas en la gónada femenina y en la reproducción, como consecuencia del tratamiento con la droga o de la exposición intrauterina y durante la lactancia.
- II) Sus acciones mitigantes de los daños causados por una dieta alta en grasas en el ovario y la fertilidad femenina, tanto en hembras tratadas de forma directa, como expuestas durante la gestación y la lactancia.

### **I) Metformina en condiciones fisiológicas:**

El hipoglucemiantre metformina posee acciones en el sistema reproductor femenino. Sin embargo, su mecanismo de acción y si sus efectos podrían ser independientes de la regulación metabólica, aún no está esclarecido. En este capítulo se evaluaron las acciones de metformina en el ovario y la reproducción en condiciones fisiológicas, sin patologías asociadas, utilizando un modelo de ratón. Los resultados revelaron que el tratamiento con metformina tuvo efectos a nivel metabólico, disminuyendo el tejido adiposo mesentérico, y a nivel reproductivo, modificando el ciclo estral, la síntesis de progesterona y estradiol, la foliculogénesis y la angiogénesis ovárica, sin alterar la fertilidad de los animales.

Las crías expuestas a la droga durante la gestación y lactancia presentaron menor peso al nacer y mayor tejido adiposo gonadal en la adultez. Además, la foliculogénesis y la angiogénesis ovárica se vieron alteradas, sin observarse cambios en la fertilidad. La segunda generación de los animales tratados presentó mayor peso al nacer.

Este estudio aporta evidencia de las acciones de metformina en el ovario y la reproducción femenina en ratones, brindando información que ayude a reposicionar a esta droga, más allá de sus efectos en el metabolismo de la glucosa.

## **II) Metformina en condiciones patológicas provocadas por una dieta alta en grasas:**

La reproducción femenina es altamente dependiente de un correcto aporte de energía, observando consecuencias en casos de desbalances entre la ingesta y el gasto energético. En este capítulo se estudiaron los efectos ováricos y reproductivos de la ingesta de una dieta alta en grasas en ratones hembra y del tratamiento con metformina. Los resultados revelaron que la dieta alta en grasas provocó importantes alteraciones metabólicas y que, además, a nivel reproductivo, modificó el ciclo estral, la ovulación, la síntesis de progesterona, la angiogénesis y fibrosis ovárica, el daño genómico y la fertilidad de las hembras. Por su parte, el tratamiento con metformina logró mitigar o en muchos casos revertir los efectos negativos provocados por la dieta.

Las crías expuestas a la dieta alta en grasas durante la gestación y lactancia presentaron alteraciones en el peso corporal al momento del destete, y mayor tejido adiposo en la adultez. Además, el ciclo estral, la ovulación y la angiogénesis ovárica se vieron alteradas. La segunda generación de los animales tratados presentó mayor peso al nacer. La exposición a metformina junto con la dieta, logró revertir las alteraciones metabólicas y en la fertilidad observadas en las crías.

Este estudio evidencia las consecuencias negativas de la dieta alta en grasas en la gónada femenina y en la reproducción; tanto por la ingesta de forma directa, como por la exposición intrauterina y durante la lactancia. También aporta evidencia sobre los efectos benéficos del tratamiento con metformina en el sistema reproductor femenino ante condiciones metabólicamente patológicas.

**PALABRAS CLAVE:**

Ovario; Metformina; Reproducción; Angiogénesis; Dieta alta en grasas; Progenie.

# **Metformin and female fertility: effects on physiological and pathological conditions caused by a high fat diet**

## **ABSTRACT**

This study addresses two aspects of the hypoglycemic agent metformin:

- I) Its effects under physiological conditions on the female gonad and reproduction, as a consequence of drug treatment or intrauterine and lactational exposure.
- II) Its mitigating actions against damage caused by a high-fat diet in the ovary and female fertility.

### **I) Metformin under physiological conditions:**

The hypoglycemic agent metformin has effects on the female reproductive system. However, its mechanism of action and whether these effects could be independent of metabolic regulation remain unclear. In this chapter, the effects of metformin on the ovary and reproduction under physiological conditions, without associated pathologies, were evaluated using a mouse model. The results revealed that metformin treatment had metabolic effects, reducing mesenteric adipose tissue, and reproductive effects, altering the estrous cycle, progesterone and estradiol synthesis, folliculogenesis, and ovarian angiogenesis, without affecting fertility.

Animals exposed to the drug during gestation and lactation exhibited lower birth weight and increased gonadal adipose tissue in adulthood. Additionally, ovarian folliculogenesis and ovarian angiogenesis were altered, although no changes in fertility were observed. The second generation of treated animals showed higher birth weight.

This study provides evidence of the effects of metformin on the ovary and female reproduction in mice, offering information that may help reposition this drug beyond its effects on glucose metabolism.

## **II) Metformin under pathological conditions induced by a high-fat diet:**

Female reproduction is highly dependent on proper energy supply, with consequences arising from imbalances between energy intake and expenditure. In this chapter, the ovarian and reproductive effects of a high-fat diet in female mice and the effects of metformin treatment were studied. The results revealed that the high-fat diet caused significant metabolic alterations and, additionally, modified the estrous cycle, ovulation, progesterone synthesis, angiogenesis, ovarian fibrosis, genomic damage, and fertility. Meanwhile, metformin treatment managed to mitigate or, in many cases, reverse the negative effects caused by the diet.

The offspring exposed to the high-fat diet during gestation and lactation showed alterations in body weight at the time of weaning and increased adipose tissue in adulthood. Furthermore, the estrous cycle, ovulation, and ovarian angiogenesis were affected. The second generation of treated animals exhibited higher birth weight. Metformin exposure alongside the diet was able to reverse the metabolic and fertility alterations observed in the offspring.

This study highlights the negative consequences of consuming a high-fat diet on the female gonad and reproduction, as well as the beneficial effects of metformin treatment on the female reproductive system under metabolically pathological conditions.

### **KEYWORDS:**

Ovary; Metformin; Reproduction; Angiogenesis; High-Fat Diet; Offspring.

## AGRADECIMIENTOS

*La realización de este trabajo de tesis no hubiera sido posible sin la participación, la ayuda, el apoyo y el afecto de muchas personas, a quienes en esta instancia quiero agradecer:*

A mi directora, **Dalhia**, por su guía, paciencia y dedicación a lo largo de estos años. Por confiar en mí para la realización de un proyecto pensado por ella, cuando todavía era una estudiante inexperta. Por ayudarme a evitar que las inseguridades me jueguen una mala pasada. Por expresarme sus ganas de seguir trabajando juntas, pero darme la libertad y el apoyo para elegir el camino que yo decida. Agradezco su acompañamiento, que fue fundamental para mi crecimiento académico y profesional.

A mi directora adjunta, **Fernanda**, por abrirme las puertas de su laboratorio. Por su generosidad para compartir conocimiento. Por brindarme un espacio de trabajo enriquecedor y motivador, por la ayuda ante cualquier inconveniente y por todo el aprendizaje que me llevo de esta experiencia, que me permitió terminarla siendo muy distinta a como la empecé.

A mi consejera de estudios, **Cecilia Varone**, por la orientación brindada a lo largo de este camino.

A la **Universidad de Buenos Aires**, por su formación académica de excelencia y por ser durante tantos años un espacio de crecimiento intelectual y personal.

Al **Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)**, por brindarme un entorno de trabajo ideal para el desarrollo de mi tesis doctoral. Por encontrar en sus instalaciones los recursos necesarios para llevar adelante mi investigación, además de un ambiente de colaboración e intercambio.

A las fuentes de financiamiento y de becas, **Agencia y CONICET**, que permitieron la realización de este trabajo de investigación y el desarrollo de esta tesis.

A **Yamila**, con quien arranqué el doctorado a la par, mi compañera de mesada y de tantas charlas. Por todo lo que aprendimos y por nuestros hermosos primeros viajes solas, pero juntas.

A **Melanie y Mayra**, por traer con su llegada tantas risas y diversión al laboratorio. Por ayudarme cuando lo necesité y por confiar en mi cuando pude ayudarlas.

A **Rocío y Majo**, por los almuerzos de todos los días, las charlas y salidas compartidas.

A **Noelia**, con quien empecé compartiendo un modelo animal, y terminé compartiendo alegrías, risas, ideales, profundas charlas y algunas angustias. Por acompañarme en este recorrido y por, sin darse cuenta y creyendo que las dos éramos estudiantes, enseñarme tanto.

A todos mis **amigos y amigas** de la vida, por estar en cada etapa, y por hacerme reír en días estresantes.

A mi tía **Julia** y mi tía **Gladys**, por alegrarse y felicitarme por cada logro y meta alcanzada; y por la compañía afectuosa de siempre.

A mi cuñado, **Miguel**, por brindarse, ante cualquier circunstancia. Por ser alguien con quien se puede contar pase lo que pase, por el cariño y por los muchos años recorridos juntos.

A **Matías**, por arreglar con infinita paciencia y ternura lo que no rompió. Por cuidarme tanto y acompañarme siempre. Por ser la música, la risa, el abrazo y la calma después de cualquier día agitado. Por los hermosos momentos vividos y por todos los que quedan por vivir.

A mi **abuela**, por recordarme y sonreír al verme cuando todo lo demás ya estaba borroso. Por enseñarme que, a veces, el amor es más fuerte que el olvido.

A mi **hermana**, por caminar juntas la vida, siempre tan cerca, por la escucha atenta y los infinitos consejos. Por hacerme tía y por cubrirme en todas las situaciones que me sobrepasan, aunque a ella también la sobrepasen.

A mi **mamá** y mi **papá**, sin quienes no hubiera logrado llegar a esta instancia. Por enseñarme la importancia del estudio y del trabajo como forma de independencia y de libertad. Por haberme acompañado y apoyado siempre, por nunca dudar de mis capacidades y alegrarse con cada uno de mis logros como si fueran propios. Por ser el sostén en el que siempre sé que puedo apoyarme. Por haber trabajado toda su vida en post de que mi hermana y yo no pasemos por lo que ellos pasaron, y fundamentalmente por darme siempre tanto amor. Los llevo conmigo en cada paso que doy.

A **Juan Martín**, por permitirme sentir un amor como ningún otro, y por ser el sol en mis días más nublados.

*Agradezco, finalmente, a todas las personas que apoyan y creen en la educación pública y en el desarrollo científico como pilares fundamentales para construir un futuro más justo y equitativo.*

*Dedico esta tesis a mi sobrino, con el deseo de que nunca deje de hacerse preguntas ni de mirar la vida con ojos de niño.*

*“La utopía está en el horizonte. Me acerco dos pasos, ella se aleja dos pasos. Camino diez pasos y el horizonte se desplaza diez pasos más allá. Por mucho que camine, nunca la alcanzaré.*

*Entonces, ¿para qué sirve la utopía?*

*Para eso: sirve para caminar.”*

Eduardo Galeano

Los resultados presentados en esta Tesis de Doctorado fueron parte de los siguientes trabajos científicos publicados en revistas internacionales:

**Velazquez C**, Herrero Y, Prost K, Bordaquievich M, Neira M, Parborell F, Abramovich D.

Reproductive outcomes in female mice offspring due to maternal metformin treatment. *Life Sci.* 2025 Feb 15;363:123416. doi: 10.1016/j.lfs.2025.123416. Epub 2025 Jan 25. PMID: 39864616.

**Velazquez C**, Bordaquievich M, Herrero Y, Cohen DJ, Bianchi MS, Cuasnicu P, Prost K, Pascuali N, Parborell F, Abramovich D. **Elucidating metformin action on the ovary and fertility in healthy mice.** *Reproduction.* 2024 Sep 21;168(5):e240229. doi: 10.1530/REP-24-0229. PMID: 39133154.

**Velazquez C**, Herrero Y, Bianchi MS, Cohen DJ, Cuasnicu P, Prost K, Marinoni R, Pascuali N, Parborell F, Abramovich D. **Beneficial effects of metformin on mice female fertility after a high-fat diet intake.** *Mol Cell Endocrinol.* 2023 Sep 15;575:111995. doi: 10.1016/j.mce.2023.111995. Epub 2023 Jun 25. PMID: 37364632.

## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS-----</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL-----</b>	<b>17</b>
<b>EL OVARIO-----</b>	<b>17</b>
Foliculogénesis-----	18
Selección del folículo dominante-----	21
Atresia folicular-----	23
Ovulación-----	25
Luteinización-----	25
Ciclo ovárico en roedores-----	26
EJE HIPOTALÁMICO-HIPOFISARIO-GONADAL-----	28
<b>REPRODUCCIÓN FEMENINA-----</b>	<b>30</b>
<b>ANGIOGÉNESIS-----</b>	<b>31</b>
<b>FACTORES ANGIOGÉNICOS-----</b>	<b>35</b>
Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)-----	35
Angiopoyetinas-----	36
Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)-----	37
<b>METFORMINA-----</b>	<b>38</b>
<b><u>CAPÍTULO 1-----</u></b>	<b><u>42</u></b>
<b>INTRODUCCIÓN-----</b>	<b>43</b>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS-----</b>	<b>48</b>
<b><u>CAPÍTULO 1 A-----</u></b>	<b><u>51</u></b>
<b>METODOLOGÍA-----</b>	<b>52</b>
<i>Modelo Animal -----</i>	52
<i>Técnicas-----</i>	54
Análisis del ciclo estral-----	54
Aislamiento del tejido adiposo-----	54
Estudio de la morfología ovárica-----	55
Tinción con colorante Picosirius red (PSR) y cuantificación del área fibrótica-----	55
Fertilización in vitro (FIV) y desarrollo temprano de embriones-----	56
Inmunohistoquímica-----	57
Western blot-----	58
Parámetros metabólicos-----	59

Parámetros hormonales-----	60
Análisis estadístico-----	60
 RESULTADOS-----	61
Efectos de metformina sobre parámetros metabólicos-----	61
Efectos de metformina en el ciclo estral y las hormonas ováricas-----	64
Efectos de metformina en la expresión de proteínas esteroidogénicas-----	65
Efectos de metformina en el desarrollo folicular y la fibrosis ovárica-----	66
Efectos de metformina en la densidad y estabilidad vascular-----	68
Efectos de metformina en parámetros de fertilidad-----	70
Efectos de metformina en la calidad ovocitaria y la fertilización <i>in vitro</i> (FIV)-----	71
 DISCUSIÓN-----	72
 <b>CAPÍTULO 1 B-----</b>	<b>77</b>
 METODOLOGÍA-----	78
<i>Modelo experimental</i> -----	78
<i>Técnicas</i> -----	79
 RESULTADOS-----	80
Efectos en parámetros metabólicos-----	80
Efectos en el ciclo estral y en la producción hormonal-----	82
Efectos en el desarrollo folicular y en la expresión de la hormona antimülleriana-----	83
Efectos en la vasculatura ovárica-----	85
Efectos en parámetros de fertilidad-----	87
 DISCUSIÓN-----	89
 <b>CAPÍTULO 2-----</b>	<b>97</b>
 INTRODUCCIÓN-----	98
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS-----	104
 <b>CAPÍTULO 2 A-----</b>	<b>107</b>
 METODOLOGÍA-----	108
<i>Modelo animal</i> -----	108
<i>Técnicas</i> -----	110
Parámetros metabólicos-----	110
Análisis estadístico-----	110
 RESULTADOS-----	111

Efectos de la dieta alta en grasas y metformina en parámetros metabólicos-----	111
Efectos de la dieta alta en grasas y metformina en el ciclo estral y en la producción hormonal-----	115
Efectos de la dieta alta en grasas y metformina en la expresión de proteínas esteroidogénicas-----	116
Efectos de la dieta alta en grasas y metformina en el desarrollo folicular-----	117
Efectos de la dieta alta en grasas y metformina en la densidad y estabilidad vascular-----	118
Efectos de la dieta alta en grasas y metformina en la deposición de colágeno-----	120
Efectos de la dieta alta en grasas y metformina en parámetros de fertilidad-----	122
Efectos de la dieta alta en grasas y metformina en la calidad ovocitaria y la fertilización <i>in vitro</i> -----	123
 DISCUSIÓN-----	125
 <b>CAPÍTULO 2 B-----</b>	<b>133</b>
 METODOLOGÍA-----	134
<i>Modelo animal</i> -----	134
<i>Técnicas</i> -----	135
 RESULTADOS-----	136
Efectos en parámetros metabólicos-----	136
Efectos en el ciclo estral y en la producción hormonal-----	138
Efectos en el desarrollo folicular-----	139
Efecto sobre la densidad y estabilidad vascular-----	141
Efectos en parámetros de fertilidad-----	142
 DISCUSIÓN-----	144
 <b>CONCLUSIÓN FINAL-----</b>	<b>153</b>
 <b>BIBLIOGRAFÍA-----</b>	<b>154</b>

## ABREVIATURAS

**ABC:** área bajo la curva de glucosa

**ACTH:** hormona adrenocorticotropa

**AMPK:** proteína cinasa activada por AMP

**ANGPT-1:** angiopoyetina 1

**ANGPT-2:** angiopoyetina 2

**BSA:** albúmina de suero bovino

**CLRF:** Cuerpo lúteo recientemente formado

**D:** diestro

**DAG:** dieta alta en grasas

**DMAG:** dieta muy alta en grasas

**DMG:** diabetes mellitus gestacional

**DT2:** diabetes mellitus tipo 2

**E:** estro

**E2:** estradiol

**eCG:** gonadotrofina coriónica equina

**FA:** Folículo atrésico

**FAM:** Folículo antral maduro

**FAT:** Folículo antral temprano

**FIV:** fecundación *in vitro*

**FP:** Folículo primario

**FPA:** Folículo preantral

**FSH:** hormona folículo estimulante

**GnRH:** hormona liberadora de gonadotrofinas

**H&E:** hematoxilina-eosina

**hCG:** gonadotrofina coriónica humana

**Homa IR:** índice de evaluación de la homeostasis-resistencia a la insulina

**IMC:** índice de masa corporal

**LH:** hormona luteinizante

**Met:** metformina

**OCT:** transportadores de cationes orgánicos

**OHSS:** síndrome de hiperestimulación ovárica

**P:** proestro

**P4:** progesterona

**PDGF:** factor de crecimiento derivado de plaquetas

**PSR:** picrosirius red

**SEM:** error estándar

**SOP:** síndrome de ovario poliquístico

**TSH:** tirotropina

**TTG:** test de tolerancia a la glucosa

**VEGF:** factor de crecimiento del endotelio vascular

**VSMC:** células de músculo liso vasculares

**WB:** western blot

**α-SMA:** alfa actina de músculo liso

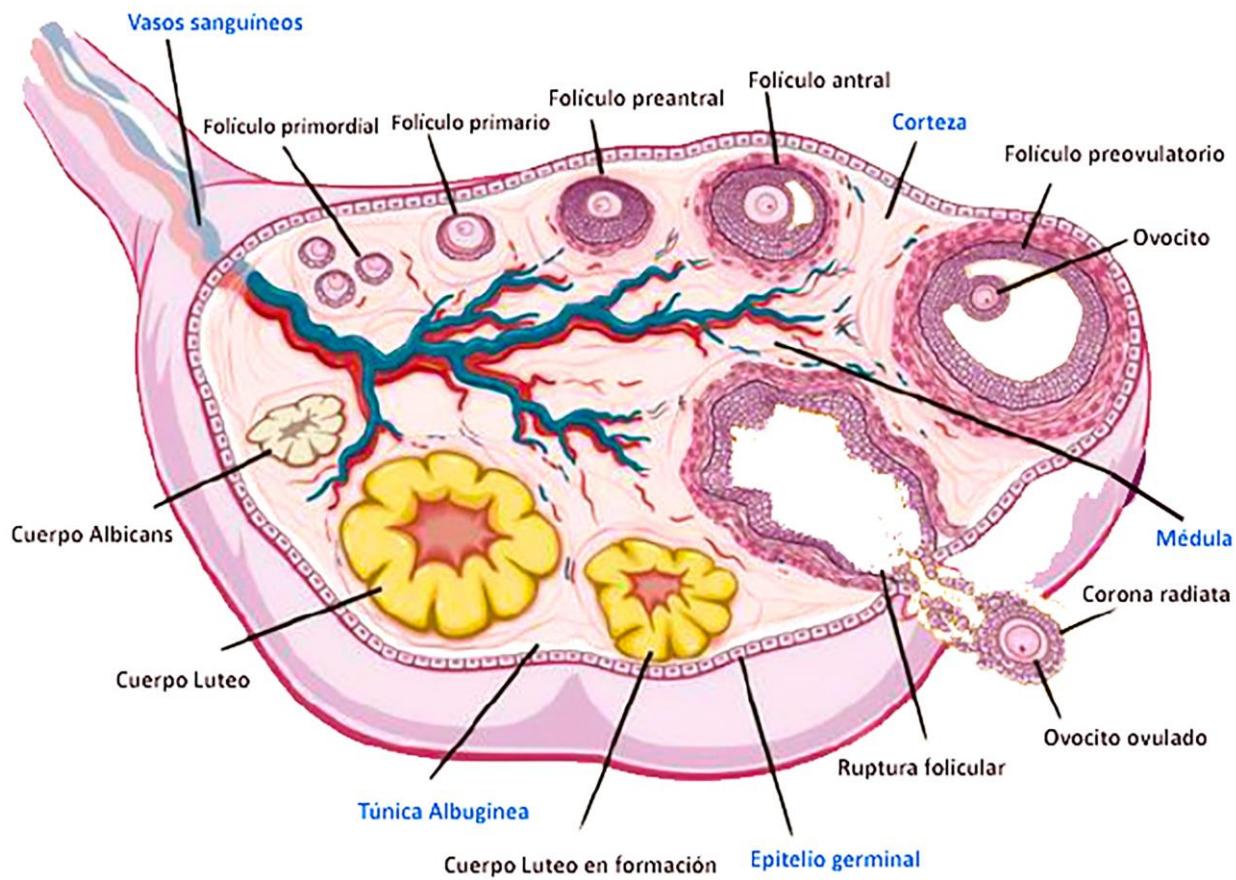
## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

### **EL OVARIO**

El ovario de mamíferos es un órgano que tiene como principal función generar, almacenar, desarrollar y liberar los ovocitos formados durante la vida fetal, como gametas completamente competentes para ser fertilizadas y para permitir el desarrollo embrionario (función gametogénica). Es además el principal portador de las células secretoras de hormonas femeninas que desarrollan y mantienen los caracteres sexuales secundarios de la hembra y preparan a los órganos reproductivos accesorios para la preñez y el nacimiento de la cría, generando un ambiente propicio para la implantación y desarrollo del cigoto (función endocrina) [1]. La función final del ovario es, por lo tanto, permitir la propagación de la especie [2].

Observando la estructura histológica del ovario es posible diferenciar dos regiones, una corteza externa y una médula interna. La médula es la porción central del tejido ovárico. Está compuesta por tejido conectivo laxo, dentro del cual se encuentran incorporados los vasos sanguíneos, los vasos linfáticos y los nervios.

La corteza es la capa más externa del ovario. Se ubica por debajo de la túnica albugínea y contiene los folículos ováricos, dentro de las cuales los ovocitos se desarrollan hasta alcanzar un estado de madurez suficiente para ser ovulados. Los folículos varían en tamaño, dependiendo de la etapa de desarrollo en la que se encuentren, proceso conocido como foliculogénesis.



**Figura 1: Estructura del ovario, desarrollo folicular, ovulación y formación del cuerpo lúteo.** Diagrama de una sección transversal de ovario mostrando su estructura histológica y los diferentes estadios de maduración folicular.

### Foliculogénesis

El proceso de foliculogénesis comprende el crecimiento del folículo ovárico y su pasaje a través de los distintos estadios de desarrollo. Antes del nacimiento, las células germinales primordiales u ovogonias cesan su división mitótica y comienzan el proceso de meiosis, quedando arrestadas en la profase de la primera división meiótica. En ese momento, pasan a denominarse ovocitos primarios. Los ovocitos se rodean de una capa única de células foliculares aplanadas llamada pregranulosa. Las superficies del ovocito y de las células foliculares envolventes son lisas y están

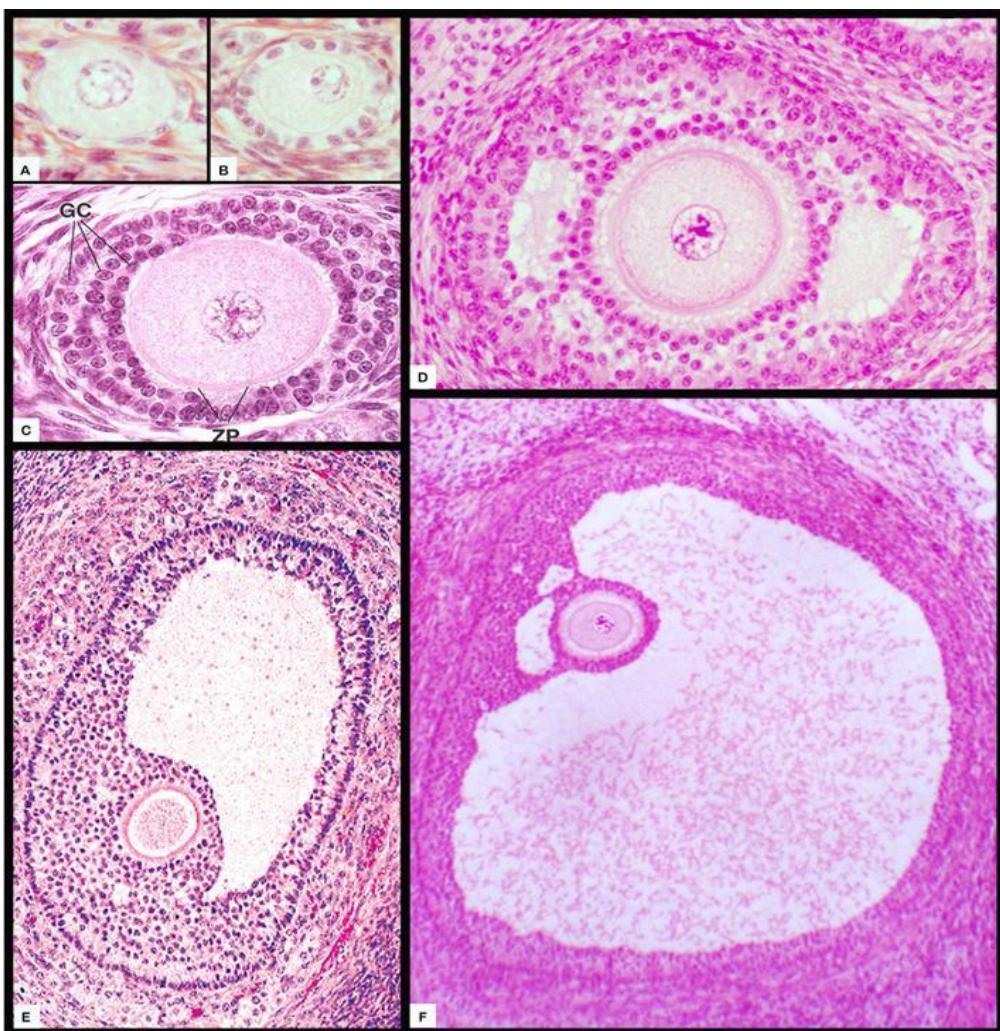
en estrecho contacto. Estos folículos se denominan *folículos primordiales* y constituyen la reserva de folículos en reposo, la cual disminuirá progresivamente durante la vida reproductiva, conforme el crecimiento de los folículos se vea activado, lográndose la ovulación o la atresia folicular. Al momento del nacimiento, el ovario humano contiene alrededor de 1.000.000 de folículos. Para que estos folículos primordiales inicien su crecimiento y desarrollo, es necesaria una compleja interacción entre factores estimulatorios e inhibitorios.

Cuando los folículos primordiales abandonan su estado de quiescencia se convierten en *folículos primarios*, en los cuales la capa única de células de granulosa deja de ser plana para pasar a ser cúbica. Esta transición implica ciertas modificaciones citológicas en el ovocito, en las células foliculares y en el tejido conjuntivo adyacente. A medida que el ovocito aumenta de tamaño, las células de granulosa se dividen mediante el proceso de mitosis, y forman posteriormente un epitelio estratificado. Cuando el folículo desarrolla dos o más capas de células de granulosa cúbicas rodeando al ovocito pasa a denominarse *secundario o preantral*. Estos folículos poseen una o dos arteriolas conectadas a la red vascular fuera de la lámina basal, por lo tanto, el folículo entra en contacto con factores que se encuentran en circulación. En este estadio las células de la granulosa adquieren receptores de alta afinidad para la hormona folículo estimulante (FSH) y hormonas esteroideas. Simultáneamente se desarrolla alrededor del folículo otra capa de células originadas del estroma: las células de la teca. El comportamiento tecal se diferencia en una capa interna y otra externa, la cual está compuesta por una mayor proporción de tejido conectivo. Numerosos vasos pequeños penetran en la teca externa para proporcionar un rico plexo capilar a la teca interna. Con el aumento de la vascularización de la teca, aumenta la exposición del folículo a factores que circulan por la sangre.. El comportamiento de la granulosa, por su parte, permanece avascular durante todo el crecimiento del folículo. A medida que las células teca-intersticiales avanzan en su diferenciación, adquieren receptores

para la hormona luteinizante (LH) y la capacidad de sintetizar esteroides. Al aumentar de tamaño el folículo, se termina de formar la zona pelúcida, definida como una fina capa acelular formada por glicoproteínas, que recubre al ovocito de los mamíferos. Las células de la granulosa mantienen contacto con el ovocito a través de proyecciones citoplasmáticas que penetran la zona. Al final de esta fase, denominada preantral, el ovocito detiene su crecimiento y se vuelve competente para reasumir la meiosis.

Cuando el folículo alcanza un diámetro aproximado de 0,2 mm y posee de seis a doce capas de células (en humanos), aparecen espacios irregulares, llenos de un líquido claro, entre las células de la granulosa. Este líquido, denominado fluido folicular, aumenta en cantidad a medida que crece el folículo, provocando que eventualmente los espacios confluyan para constituir una sola cavidad denominada antro, lo que marca el comienzo de la *fase antral*. El compartimento de la granulosa del folículo antral presenta un engrosamiento localizado en uno de sus lados, llamado cumulus oophorus; sus células se encuentran unidas entre sí y al ovocito mediante uniones estrechas. Al desprenderse el ovocito, una o más capas de células del cumulus permanecen unidas a él, formando la corona radiata, una envoltura celular laxa que persiste aún después de la ovulación.

La aparición de los receptores de LH en las células de la granulosa ocurre durante la transición del folículo antral hacia el folículo preovulatorio, debido a la estimulación de FSH [3]. Los folículos preovulatorios son aquellos que han alcanzado los estadios finales de madurez y han adquirido la habilidad para ovular ante los adecuados niveles de LH o la administración de gonadotrofina coriónica humana (hCG). Desde el momento en que el folículo ha sido seleccionado para la ovulación, el mismo comienza a crecer notablemente y las células de la granulosa sufren transformaciones morfológicas, tales como el aumento de su volumen [4]. Al folículo cuyo destino es la ovulación, se lo denomina folículo dominante [5].



**Figura 2: Clasificación de los estadíos del desarrollo folicular en ovario.** A. Folículo primordial. B. Folículo primario. C. Folículo preantral. D. Folículo antral temprano. E. Folículo antral maduro. F. Folículo preovulatorio o de Graaf. GC: Células de la granulosa. ZP: Zona pelúcida.

#### Selección del folículo dominante

El reclutamiento cíclico y la selección de los folículos representa un proceso continuo, que eventualmente finaliza con la formación de uno o más folículos preovulatorios, cuyo número varía en cada especie. En los primeros días del ciclo menstrual en la mujer, aumentan los niveles circulantes de FSH. Como consecuencia, una cohorte de folículos antrales escapa de la apoptosis

que los llevaría a la atresia folicular. Dentro de este grupo, alrededor de 10 folículos antrales crecen más rápido y producen altos niveles de estrógenos e inhibina, seleccionándose entre éstos el folículo dominante.

A pesar de que no se conoce exactamente por qué un folículo emerge como dominante, se postula que éste posee una mayor sensibilidad a FSH, debido a una mayor expresión de receptores para esta gonadotrofina. Asociado a este proceso, las grandes concentraciones de estradiol (E2) y de factores de crecimiento locales producidos por los folículos en crecimiento, ejercen un efecto permisivo, amplificando la acción de la FSH. Sin embargo, el aumento de estradiol e inhibina, también ejerce una retroalimentación negativa sobre la liberación de FSH a nivel hipotálico-hipofisario, lo cual evita que otros folículos, menos sensibles a esta hormona, sigan desarrollándose [2,6].

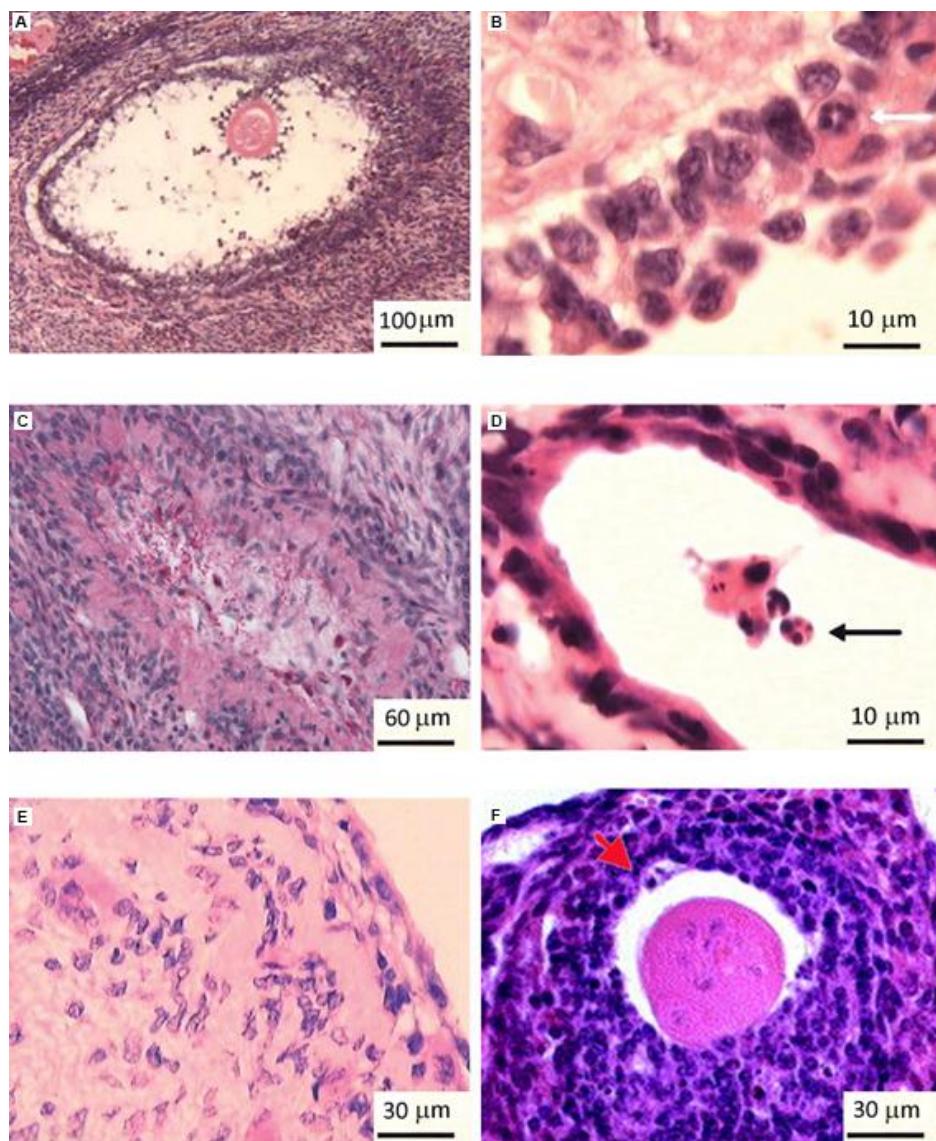
La disminución de FSH como consecuencia del efecto inhibitorio a nivel hipotalámico-hipofisario, provoca además un descenso de la actividad de la aromatasa dependiente de FSH (enzima que transforma andrógenos a estrógenos). En consecuencia, se encuentra limitada la disponibilidad de estrógenos en los folículos menos maduros. Esto lleva a la disminución de la proliferación de las células de granulosa y al aumento de las concentraciones de andrógenos, que causan una atresia irreversible.

El folículo dominante posee una sensibilidad única a la FSH, que le permite aumentar la proliferación de sus células de granulosa y obtener de esta forma una mayor cantidad de receptores para esta gonadotrofina. Además, los folículos seleccionados tienen una mayor vasculatura en el compartimento tecal, lo que lleva a una entrada preferencial de FSH. Por lo tanto, estos folículos no sólo tienen la ventaja de tener mayor número de receptores para FSH, sino que además poseen una gran vasculatura que permite un fácil acceso para esta hormona. En la rata, bajo el estímulo de FSH y en presencia de estrógenos, las células expresan receptores

para LH y prolactina, los cuales van aumentando hasta llegar a valores máximos antes de la ovulación [7,8]. El aumento de estrógenos provoca, además, por un mecanismo de retroalimentación positiva, la estimulación del pico preovulatorio de LH. Estos procesos, actuando en forma sincronizada, permiten la selección de los folículos dominantes hasta llegar a la ovulación [2]. Por otro lado, se ha postulado, que el folículo dominante produce también factores que inhiben el desarrollo de los folículos vecinos o subordinados [2,9].

### Atresia Folicular

La atresia folicular es uno de los mecanismos característicos en vertebrados mamíferos y no mamíferos. En humanos, se calcula que más del 99% de los folículos sufren cambios degenerativos durante el normal funcionamiento ovárico. El proceso por el cual los folículos son eliminados se denomina atresia. Este fenómeno ocurre por la apoptosis de las células de granulosa y del ovocito. La atresia folicular podría significar una ventaja evolutiva, siendo seleccionados aquellos folículos que contengan ovocitos saludables para que puedan llegar exitosamente a ser ovulados. El tipo celular que evidencia el proceso de apoptosis más claramente es el de las células de granulosa. Sin embargo, en algunas especies como cerdos, pollo y rata, se ha observado la ocurrencia de este proceso en las células de la teca, aunque de forma más tardía [10,11].



**Figura 3: Microfotografías de folículos atrésicos equinos teñidos con hematoxilina-eosina.** A: folículo atrésico. B: células de granulosa de un folículo atrésico. Nótese la condensación de la cromatina (flecha blanca). C: folículo en estado de atresia avanzada, con restos de proteínas de la zona pelúcida en la zona central. D: células de la granulosa desprendidas de un folículo atrésico, se pueden observar cuerpos apoptóticos y núcleos picnóticos (flecha negra). E: células tecales de un folículo atrésico avanzado, algunas han adquirido característica de tejido conectivo. F: folículo atrésico, con ovocito en degeneración. Obsérvese la retracción del citoplasma del oocito (flecha roja). Modificado de Pedersen y col. (2003) [12].

### Ovulación

A medida que se acerca la mitad del ciclo, hay un ascenso notable de estrógenos por sobre el umbral, el cual estimula, por un mecanismo de retroalimentación positiva, un pico de gonadotrofinas (LH y en menor medida de FSH). El pico de LH es el gatillo para que el folículo dominante ovule y origine un cuerpo lúteo en cada ciclo menstrual en humanos (éste no es único en el ciclo estral de roedores y otros mamíferos). En este momento la síntesis de E2 declina considerablemente, mientras que se produce un aumento notable en la producción de progesterona (P4) [13].

En este proceso también existe un componente mecánico dado por el rápido aumento del tamaño folicular. Otro prerequisito para la ruptura folicular es la digestión proteolítica de la pared folicular, para la cual se activan colagenasas que degradan la membrana basal y el tejido tecal [14].

Luego de la ovulación, el folículo ovárico se transforma en cuerpo lúteo. Además, el ovocito que estaba detenido en profase I, reasume la meiosis y es ovulado en el estadio de metafase II.

### Luteinización

El cuerpo lúteo es un órgano endocrino transitorio formado por las células foliculares remanentes del folículo que ha sido ovulado (Figura 1). Su principal acción consiste en secretar progesterona, la cual tiene numerosas funciones, entre ellas, la preparación del útero para el período de preñez o embarazo y la regulación de las contracciones del oviducto para el transporte del óvulo al útero. Por lo tanto, la formación del cuerpo lúteo en mamíferos se considera un evento esencial para la supervivencia e implantación del embrión. El

establecimiento de un cuerpo lúteo funcional, en los días siguientes a la ovulación, implica cambios morfológicos y además una rápida vascularización de las capas celulares que se originan de la granulosa y de la teca, fenómeno inducido probablemente por la ruptura de la membrana basal que separa a los dos tipos celulares. Estudios recientes, han demostrado que el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) cumple un rol importante en el desarrollo y mantenimiento de un cuerpo lúteo funcional [15]. En ausencia de embarazo o preñez al final de cada ciclo ovárico, o cuando ya no es requerido para el mantenimiento de la placenta, el cuerpo lúteo deja de producir progesterona y regresiona en un proceso denominado luteólisis. Se ha demostrado que la muerte celular programada o apoptosis está asociada a este proceso [16–18].

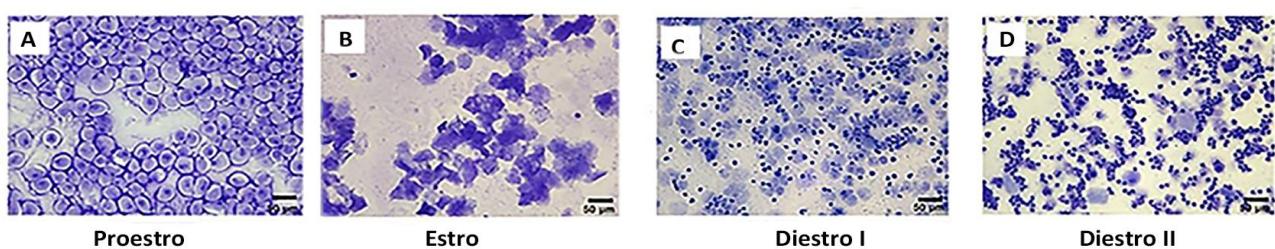
### Ciclo ovárico en roedores

Tanto el ratón como la rata de laboratorio son mamíferos no estacionales, de ovulación espontánea y poliéstricos. Es decir, el ciclo ovárico ocurre durante todo el año y la ovulación no depende del estímulo de la cópula. Por dichas características, sumadas a su fácil reproducción y mantenimiento en el bioterio, representan un modelo excelente para el estudio de la fisiología ovárica.

El término *estro* fue utilizado por primera vez por Heape en el año 1900 para describir el período durante el cual la hembra está dispuesta a recibir al macho en coito fecundante. Heape denominó *proestro* al período anterior al estro, y se caracteriza por el momento en el cual el animal entra en celo. Se puede distinguir mediante un frotis vaginal por la presencia de células epiteliales pequeñas, redondas nucleadas, de aspecto y tamaño uniforme, sin observarse presencia de neutrófilos [19]. Es el período durante el cual finaliza el desarrollo de los folículos y concluye con la ovulación, dando inicio a la fase de estro [19]. El estro se caracteriza por la

presencia predominante de células epiteliales queratinizadas anucleadas [20]. En ausencia de concepción, el ciclo progresiona hacia el *metaestro*, también conocido como *diestro I*, que se corresponde con el desarrollo inicial de los cuerpos lúteos, los cuales secretan progesterona por un breve período de tiempo [19]. El *diestro I* se caracteriza por la presencia de una combinación de células epiteliales anucleadas, células epiteliales queratinizadas y neutrófilos [20]. El período siguiente, *diestro II*, constituye el tiempo durante el cual la secreción ovárica prepara a los tejidos reproductivos para la recepción del óvulo fertilizado. En esta fase se observa una marcada disminución de células epiteliales anucleadas queratinizadas, con abundante presencia de neutrófilos y alguna presencia de células epiteliales redondas al finalizar el estadio [20]. En el estadio de *diestro II* los cuerpos lúteos alcanzan su máxima actividad y el epitelio de la vagina se encuentra en su mínimo nivel de desarrollo [19]. Tanto el *diestro I* como el *diestro II* son fases anovulatorias dentro del ciclo estral.

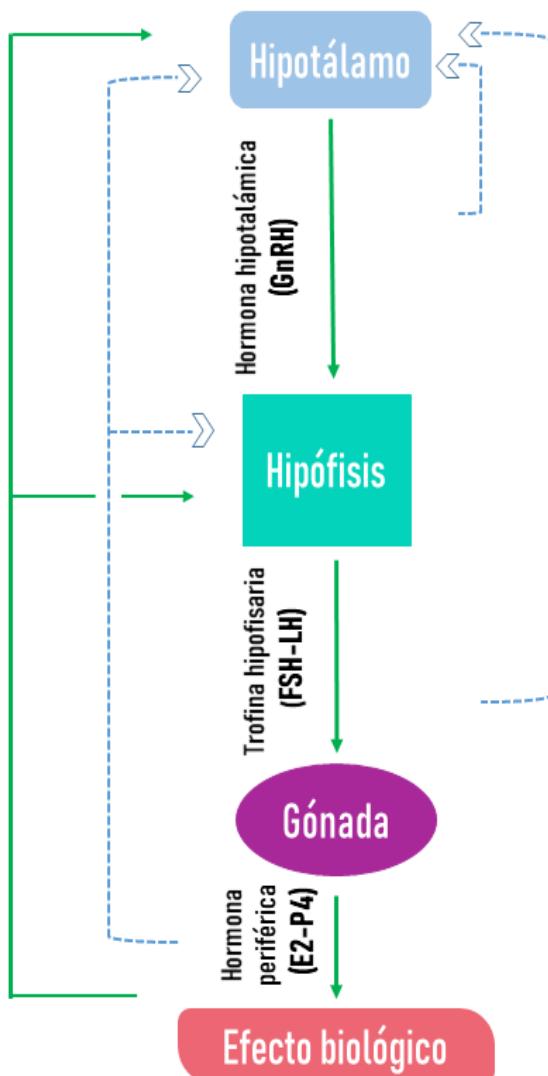
Un rasgo particular de los roedores es la capacidad de entrar en estro dentro de las 24 horas posteriores al parto. Este fenómeno se conoce como estro post-parto y permite a la hembra quedar preñada inmediatamente, aumentando su prolificidad.



**Figura 4. Citología vaginal representativa de cada fase del ciclo estral.** A) Proestro. B) Estro. C) Diestro I. D) Diestro II. Figura adaptada de McLean y col. [21].

## EJE HIPOTALÁMICO-HIPOFISARIO-GONADAL

El eje hipotalámico-hipofisario-gonadal (HPG) es un sistema neural y endocrino intercomunicante que funciona en la regulación de la fertilidad, permitiendo no solo el correcto desarrollo de las gametas, sino también el dimorfismo sexual y funcional y el comportamiento sexual. El control de la secreción hormonal sucede a través del mecanismo de retroalimentación, en donde se presenta una interrelación entre el hipotálamo y la hipófisis con las gónadas, cuya producción hormonal periférica interactúa con el sistema hipotálamo-hipofisario, regulando a su vez la síntesis y liberación de las hormonas tróficas que afectan a las glándulas [22] (Figura 5).



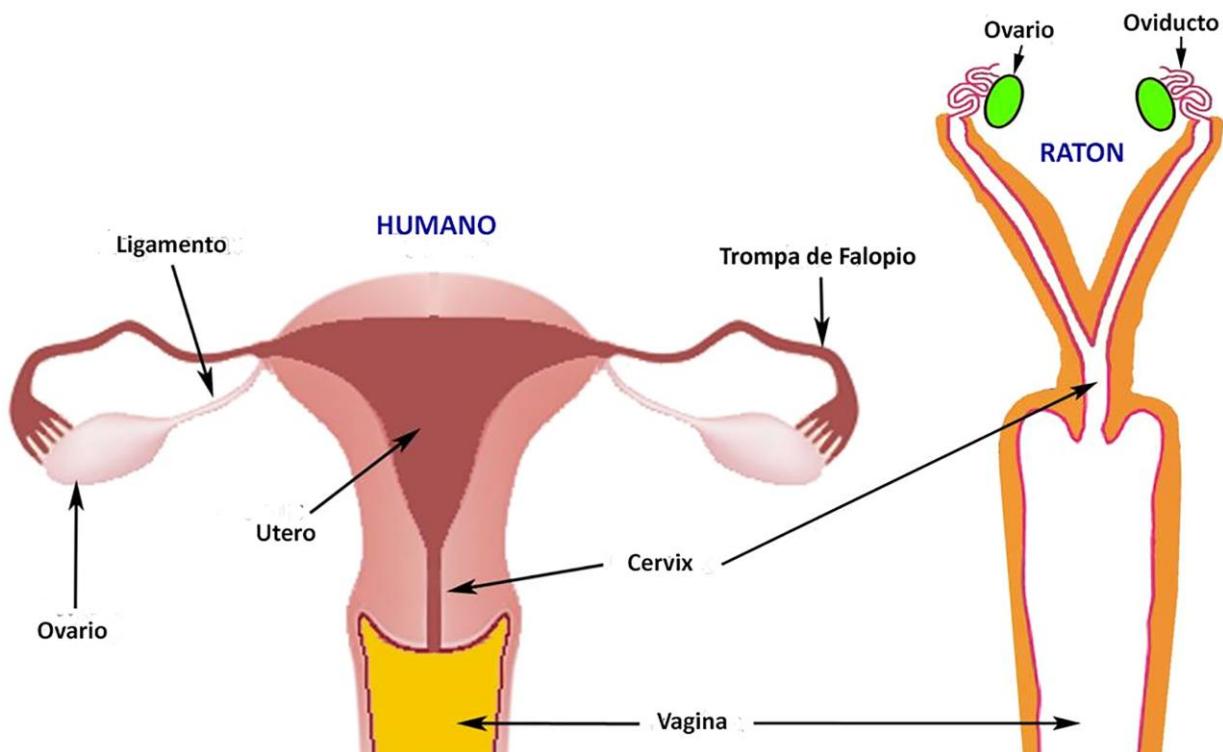
**Figura 5. Esquematización del eje hipotalámico-hipofisario-gonadal.** Se muestran los tres niveles de regulación y se esquematiza el mecanismo de retroalimentación, en donde las líneas sólidas indican acciones estimulatorias y las punteadas señalan acciones inhibitorias.

La hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) es producida por neuronas secretoras ubicadas en los núcleos arcuato y ventromedial en primates. En las células gonadotropas de la hipófisis cuenta con un único receptor, el cual induce la secreción de LH y FSH. Para lograr un efecto óptimo de GnRH sobre su receptor, el estímulo de la misma debe ser en forma de pulsos, logrando que los receptores (de membrana) se sinteticen, aumenten su número y/o se desenmascaren volviéndose visibles y mejorando la respuesta (fenómeno conocido como up-regulation). Las neuronas GnRH están a su vez bajo el control de esteroides gonadales, hormonas hipotalámicas, neurotransmisores y estímulos ambientales y estresores.

En la hipófisis, entre el 10 y el 15% de las células son gonadotropas, capaces de cosecretar LH y FSH, de forma independiente. En la mujer, durante la mayor parte del ciclo los niveles circulantes de estas gonadotrofinas son bajos, lo cual regula el desarrollo folicular y la secreción de estradiol (durante la fase folicular del ciclo) y de progesterona (durante la fase lútea). La secreción basal de LH y FSH está regulada por la retroalimentación negativa ejercida por los esteroides ováricos, principalmente estradiol. En cambio, el pico preovulatorio de LH y FSH es gatillado por una retroalimentación positiva provocada por este esteroide, que desencadena la ovulación y la subsiguiente formación del cuerpo lúteo.

## **REPRODUCCIÓN FEMENINA**

La literatura está repleta de numerosos ejemplos del valor de los modelos animales. Los ratones se consideran un modelo animal excelente porque son pequeños, manejables, fáciles de criar en cautividad y con un ciclo vital rápido. Aunque tanto los humanos como los ratones son mamíferos con ovarios, trompas de Falopio, útero y placentación similares, existen varias diferencias estructurales y funcionales entre el sistema reproductor femenino de ambas especies (Figura 6). En particular, la anatomía macroscópica varía considerablemente, mientras que la apariencia histológica y las funciones básicas tienden a ser más similares.



**Figura 6: Diagrama comparativo entre el aparato reproductor femenino de humanos y de ratones.** La diferencia más notable se observa en el útero bicorne de los ratones. Imagen adaptada de Gerald R Cunha y col. *Reproductive tract biology: of mice and men* [23].

Los ovarios de ratones y humanos son estructuras pares de forma esférica u ovoide respectivamente. La principal diferencia anatómica entre ambos radica en que los ovarios de los ratones se encuentran dentro de una bolsa elástica transparente, conocida como bursa, inmersos en depósitos de grasa que los rodea. La pubertad en los ratones se desencadena aproximadamente a las cuatro semanas de vida, mientras que en los humanos sucede generalmente entre los diez y trece años. Durante la foliculogénesis varios folículos maduran simultáneamente en ambas especies; sin embargo, típicamente solo se libera un óvulo en humanos, mientras que en ratones se liberan varios, obteniéndose en promedio camadas de entre seis y doce crías. Dado que no se observan grandes diferencias en el proceso de maduración y ovulación, los ratones son muy buenos modelos para el estudio de la fertilidad. Conforme sucede la ovulación, los ovocitos son captados y transportados por el oviducto (en roedores) o las trompas de Falopio (en humanos) hacia el útero. Tanto los oviductos de ratón como las trompas de Falopio de humanos están compuestos por una porción intramuscular, un istmo, una ampolla, un infundíbulo y un extremo fimbriado.

En caso de haberse logrado la fecundación, los embriones se desarrollan en el útero, el cual tiene una anatomía bicorne en los ratones o con forma de “pera” en los humanos. La duración de la gestación es muy distinta entre especies, siendo entre 19 y 21 días en ratones y de 37 a 42 semanas en humanos.

## **ANGIOGÉNESIS**

Los procesos mediante los cuales se forman los vasos sanguíneos pueden dividirse en dos: vasculogénesis y angiogénesis. La vasculogénesis ocurre, principalmente, durante el desarrollo embrionario y consiste en la diferenciación de células precursoras en células endoteliales [24].

La angiogénesis es el proceso por el cual se forman vasos sanguíneos nuevos a partir de vasculatura preexistente [25]. Esta vasculatura es modificada mediante el brote y el crecimiento de nuevos vasos para formar finalmente patrones de vasos interconectados característicos de los vasos sanguíneos maduros. La vasculatura previamente formada, debe primero desestabilizarse para permitir la formación de nuevos vasos sanguíneos que irriguen tejidos previamente avasculares. Luego, las células endoteliales proliferan y forman estructuras tubulares inmaduras que terminan siendo redes vasculares interconectadas. Esta vasculatura nueva debe madurar para ser completamente funcional. Durante la maduración, las nuevas células endoteliales se integran y se unen fuertemente a células de soporte (células periendoeliales), como pericitos y células musculares lisas, y a la matriz que rodea el vaso [26]. El desenlace de este proceso en una elaborada red vascular permite cubrir las demandas nutricionales y funcionales del órgano [27].

La angiogénesis ha sido ampliamente estudiada en condiciones patológicas, observando en algunos casos una excesiva tasa mitogénica de las células endoteliales (crecimiento tumoral, retinopatías, hemangiomas, artritis reumatoidea, fibrosis, etc.) [28–30], y en otros una disminución en la angiogénesis normal (retraso en cicatrización de heridas, úlceras varicosas crónicas, falta de cicatrización de fracturas) [29].

En el adulto, es un proceso infrecuente en condiciones fisiológicas y el endotelio de la mayoría de los tejidos es una población estable y de baja tasa mitótica [28], ocurriendo angiogénesis principalmente en procesos de reparación de tejidos, como cicatrización de heridas y fracturas y de forma fisiológica únicamente en el tracto reproductor femenino, tanto en la placenta durante la implantación, como durante los cambios cíclicos que ocurren en los ovarios y el endometrio [31].

Los tejidos del sistema reproductor femenino adulto presentan una alta tasa mitogénica sólo

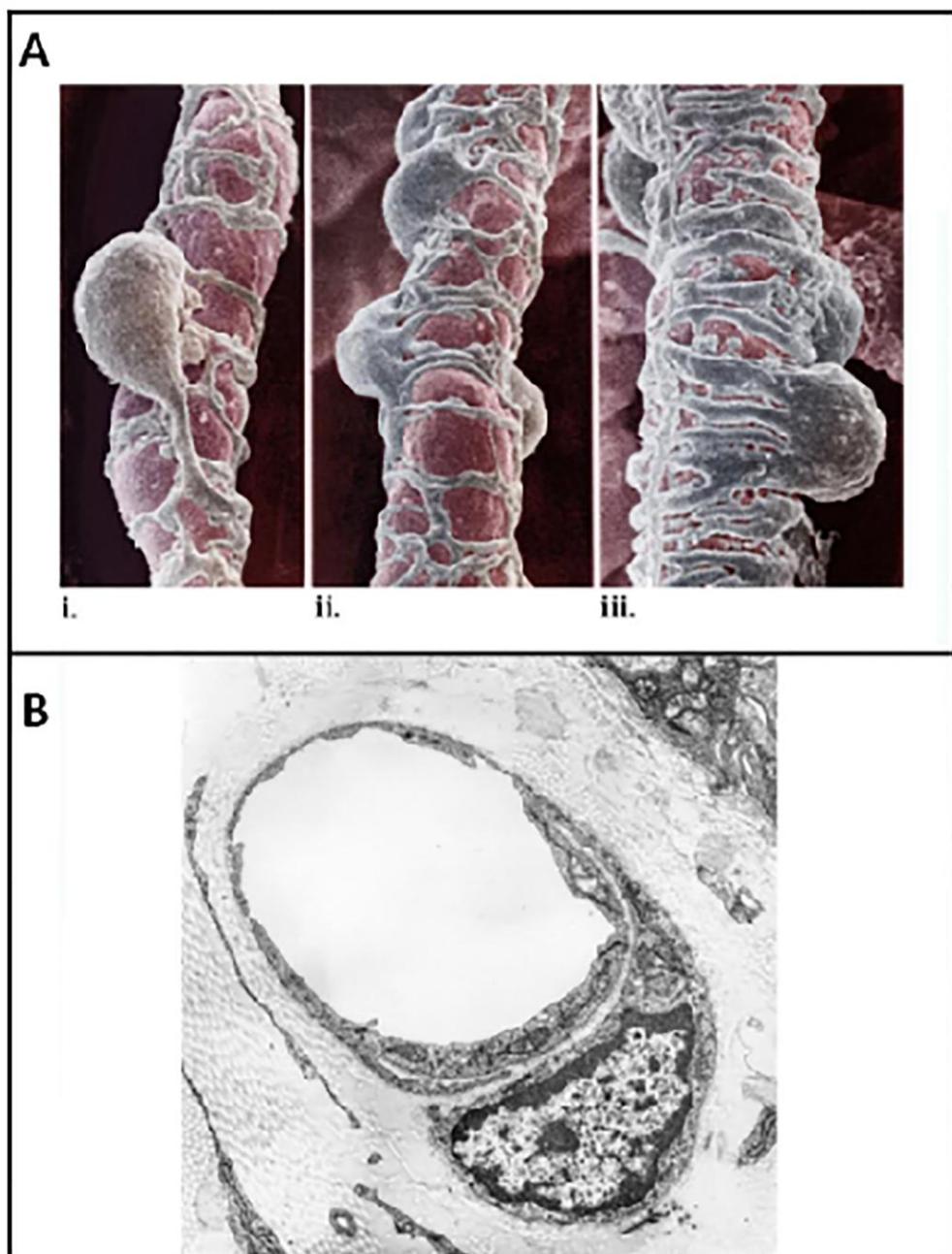
comparable al crecimiento tumoral [32]. Sin embargo, a diferencia de los procesos tumorales, el crecimiento de estos tejidos ocurre en forma limitada y muy ordenada, siendo sostenido por el rápido desarrollo de una red vascular. Es así como se observa entonces, que los tejidos con mayor tasa de crecimiento están altamente irrigados [32].

Las células peri-endoteliales, que incluyen células de músculo liso vasculares (VSMC) y pericitos, residen en la interfase entre el endotelio y el tejido circundante. Las VSMCs proveen soporte a vasos de gran calibre, como las arteriolas, y regulan el flujo sanguíneo a través de su actividad contráctil, a pesar de no estar en contacto directo con el endotelio. Por su parte, los pericitos son células perivasculares que se asocian a las células endoteliales de la vasculatura. Estructuralmente, son células individuales distribuidas a lo largo de los vasos capilares que se caracterizan por tener un cuerpo celular que se inserta en la membrana basal y que protruye por sobre la pared del capilar [33]. Estas células se contactan con el endotelio a través de zonas en las que la membrana basal está interrumpida y que son ricas en uniones comunicantes, uniones estrechas y zónulas adherentes [27]. También puede haber interdigitaciones entre células endoteliales y pericitos, tal que una célula puede formar una extensión citoplasmática dentro de la otra. Este tipo de uniones se denominan complejos “*peg and socket*” (Figura 7).

Se han propuesto diversas funciones para las células peri-endoteliales. Por ejemplo, pueden censar los requerimientos fisiológicos del tejido, la presencia de estímulos angiogénicos y las fuerzas hemodinámicas dentro del vaso; pueden controlar de manera paracrína o por contacto célula-célula la proliferación y diferenciación del endotelio; y, por último, al contactar numerosas células endoteliales en simultáneo, pueden integrar señales a lo largo del vaso sanguíneo [34]. La correcta formación del peri-endotelio es fundamental para el desarrollo de un vaso sanguíneo estable y funcional.

Hasta el momento, se conocen varios marcadores de células endoteliales, como PECAM, Factor

de Von Willenbrand (VW) y CD34. También se han hallado marcadores de células periendoeliales, como  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), desmina y antígeno de melanoma de alto peso molecular (RGS-5). Cabe resaltar que ninguno de estos marcadores es “universal”, ya que su expresión varía dependiendo de la especie, del tipo de tejido y del estado de desarrollo [35].



**Figura 7: Interacción entre endotelio y células peri-endoteliales.** A. Fotografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido y posteriormente coloreadas digitalmente. i. Pericito rodeando un capilar. Pueden observarse los procesos primarios en dirección longitudinal y los procesos secundarios orientados de forma circunferencial. ii. Capilar arterial con numerosos pericitos asociados. iii. Arteriola terminal rodeada por pericitos y algunas células de músculo liso vasculares. B. Micrografía electrónica de un capilar fenestrado y su pericito en corte transversal. Obsérvese que las células endoteliales del capilar y el pericito comparten la misma lámina basal. Tomado de Sato y col. [36].

## **FACTORES ANGIOGÉNICOS**

Para que el proceso de angiogénesis ocurra de forma adecuada y los nuevos vasos sanguíneos generados sean funcionales y estables, debe haber un delicado equilibrio entre factores pro y anti-angiogénicos. Cualquier desregulación en éstos, ya sea por exceso o por defecto, puede generar un desarrollo vascular defectuoso y, por ende, una deficiente irrigación sanguínea en el órgano. Los factores involucrados en este delicado proceso son diversos. Se detallan a continuación los principales:

### **Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)**

El VEGF-A o VEGF es un potente factor mitogénico y estimulante de la migración de las células endoteliales. También participa en el mantenimiento estructural y aumenta la permeabilidad de capilares y vénulas [33]. La molécula es una glicoproteína homodimérica básica, que se une a receptores específicos en las células endoteliales. Este factor pertenece a una familia de proteínas compuesta por VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, y el factor de crecimiento placentario (PIGF) [26]. Se sabe que varios tipos celulares, como las células endoteliales, las células del músculo liso, fibroblastos, adipocitos y células inmunes sintetizan VEGF y que este factor puede actuar tanto de manera autócrina como parácrina [37].

La síntesis de este factor está estrictamente regulada en todos los tejidos, debido a que un déficit o una sobreexpresión de esta molécula causarían diversas patologías. Esta regulación se da a través de diferentes mecanismos y factores, siendo uno de los principales, la tensión de oxígeno. Se ha demostrado que la expresión del ARNm para VEGF es inducida bajo condiciones de hipoxia ocasionadas en diversas situaciones fisiológicas o patológicas [38].

Las hormonas también son importantes reguladoras de la expresión del gen de VEGF. Se ha demostrado que la tirotropina (TSH) y la hormona adenocorticotropa (ACTH) inducen la expresión de VEGF en líneas celulares de carcinoma tiroideo y en células de la corteza adrenal en cultivo [39,40]. Las gonadotrofinas son potentes inductoras de la transcripción de VEGF en ovario, tanto *in vivo* como *in vitro* [41]. Existen además diversos estudios que ubican a los esteroides sexuales como potentes inductores de la expresión de VEGF en tejidos hormono-sensibles [42–44].

Existen tres receptores de VEGF descriptos y son de tipo tirosina quinasa. Se denominan VEGFR-1 (también llamado FLT-1), VEGFR-2 (también llamado KDR o FLK-1) y VEGFR-3 (también llamado FLT-4). El KDR es el principal receptor para VEGF responsable de la angiogénesis, mitogénesis y aumento de la permeabilidad vascular observados como respuestas a VEGF. Luego de la autofosforilación de este receptor en diversas tirosinas, se observa la fosforilación de diversas proteínas transductoras de señales. El receptor KDR además, media los efectos antiapoptóticos de VEGF descriptos en células endoteliales [45].

### Angiopoyetinas

Mientras que el VEGF es el principal iniciador de la angiogénesis, la formación y diferenciación de una red vascular madura y funcional requiere de la acción coordinada de varios factores. Entre estos se encuentran las angiopoyetinas 1 y 2 (ANGPT1 y ANGPT2) las cuales actúan a

través de sus receptores tirosina quinasa Tie-1 y Tie-2.

El sistema de ANGPTs es crítico para el normal desarrollo, maduración y estabilización de la vasculatura en desarrollo [46], así como también para promover la quiescencia e integridad estructural de la vasculatura adulta [47]. Las acciones de las ANGPTs son diferentes a las de VEGF-A. ANGPT1 actúa en forma coordinada y complementaria al VEGF-A, jugando un papel más tardío en el desarrollo vascular. Mientras que la ANGPT1 se expresa ampliamente y en forma constitutiva en tejidos adultos normales para cumplir su función estabilizadora de los vasos ya formados, ANGPT2 está altamente expresada sólo en sitios con alto grado de angiogénesis y en sitios de regresión de la vasculatura. Se postula que ANGPT2 es un factor desestabilizante de vasos sanguíneos, permitiendo que otros factores angiogénicos puedan ejercer sus efectos [48]. Por lo tanto, la alta expresión de ANGPT2 resulta en la desestabilización de los vasos, lo que, en presencia de VEGF-A, conduce a la proliferación de las células endoteliales y formación de vasos sanguíneos nuevos. Por el contrario, la alta expresión de ANGPT2 en ausencia de VEGF-A, resulta en la regresión de la vasculatura [49].

#### Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)

La familia de factores PDGF juega un papel crítico en la proliferación y desarrollo celular [50–52]. El PDGF fue el primer factor sérico identificado como factor que estimula la proliferación de las células del músculo liso arterial [53] y se sabe que es sintetizado por un amplio rango de tipos celulares dentro de los cuales se incluyen plaquetas, fibroblastos, ovocitos y blastocitos [54]. La forma biológicamente activa de PDGF es un dímero formado por dos cadenas polipeptídicas, unidas por puentes disulfuro [55]. Puede estar presente como homodímero o como heterodímero y dependiendo del tipo de dímero formado muestra actividad diferencial. Las cinco isoformas de PDGF son: AA, AB, BB, CC y DD, siendo las cadenas C y D las más

recientemente identificadas.

El PDGF-BB cumple un papel vital en la angiogénesis: la señalización vía su receptor (PDGFR- $\beta$ ) es crítica para el reclutamiento de células musculares lisas. Durante la remodelación angiogénica, PDGF-BB es expresado por las células endoteliales ubicadas en los ápices de los vasos sanguíneos nacientes, lo cual conduce a la proliferación de pericitos y células de músculo liso vasculares que expresan PDGFR- $\beta$ . El PDGF-BB determina también la migración y/o la supervivencia de estas células peri-endoteliales a lo largo del endotelio incipiente. Una vez que llegaron a destino, los pericitos y células de músculo liso vasculares rodean al endotelio y se asocian estrechamente con él. Los factores de supervivencia y anti-proliferativos producidos por las células peri-endoteliales estabilizan los vasos nacientes [50–52,56]. El rol de PDGF-BB es de gran relevancia porque la gran mayoría de los vasos sanguíneos, sino todos, comienzan como tubos endoteliales que luego adquieren un recubrimiento de pericitos o células de músculo liso vasculares. Está demostrado que el reclutamiento de células peri-endoteliales es vital para una completa funcionalidad del vaso sanguíneo, y que tanto PDGF-BB como PDGFR $\beta$  son indispensables [49,57,58]. Además de su rol angiogénico, la vía de señalización de PDGF-BB está involucrada en el desarrollo de las células de la teca y en la producción de esteroides por parte del ovario [59]. En nuestro laboratorio se demostró que la vía de señalización de PDGF-BB es además necesaria para un correcto desarrollo folicular en rata [60]. A su vez, la señalización de PDGF-BB/ PDGFR $\beta$  ha sido reconocida como una de las vías involucradas en foliculogénesis temprana, promoviendo la activación del folículo primordial [61–63]. En este sentido, los efectos de PDGF-BB son opuestos a los efectos de la hormona anti Mülleriana (AMH).

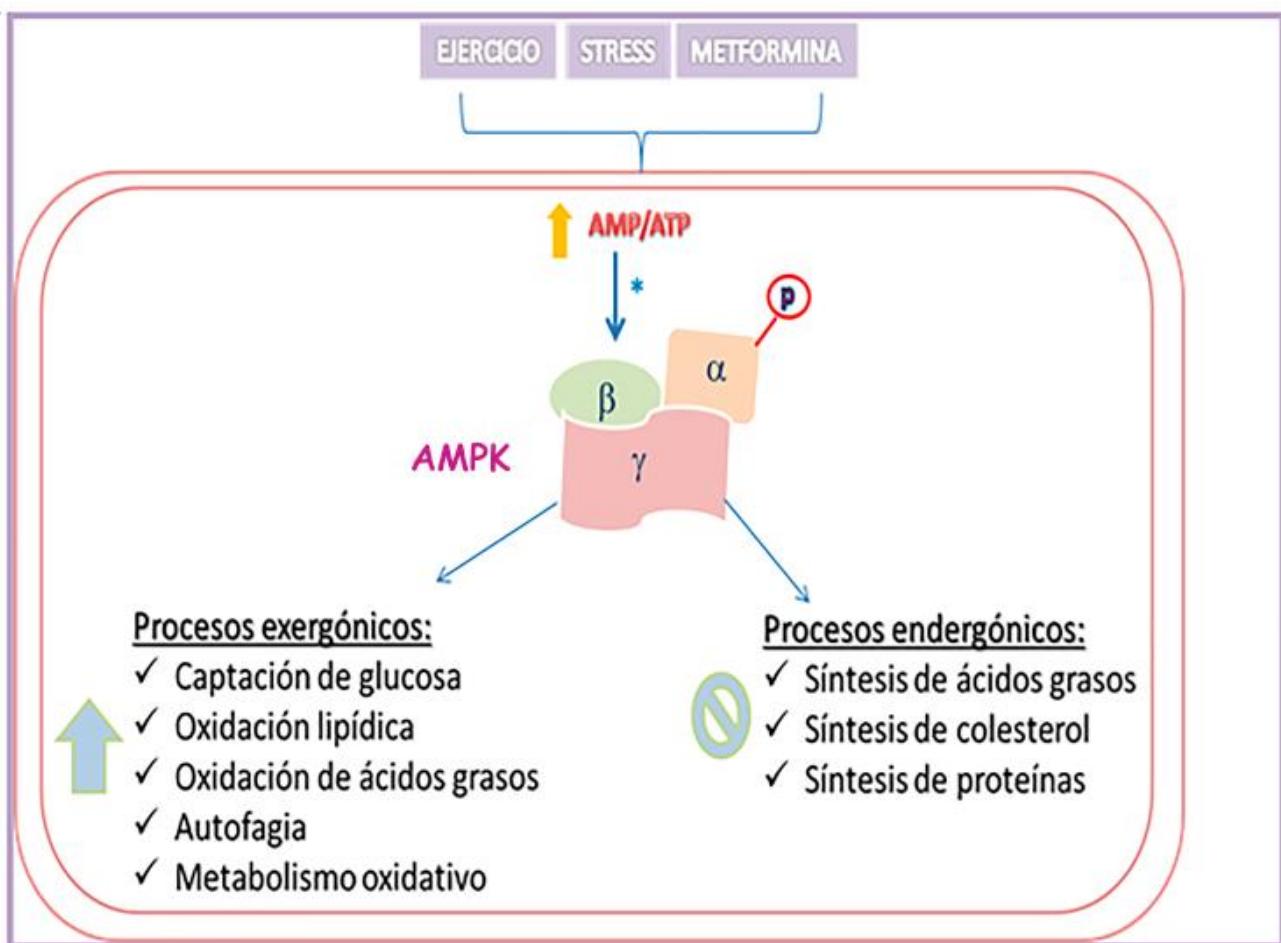
## **METFORMINA**

La metformina es una biguanida utilizada como hipoglucemiano oral para el tratamiento de la

diabetes tipo 2 (DT2). Se introdujo en el Reino Unido en 1958 para el tratamiento de esta patología y, años más tarde, para el tratamiento de pacientes con síndrome de ovario poliquístico (SOP) que presentaban hiperglucemia y resistencia a insulina. Sin embargo, los efectos de esta droga son variados y exceden ampliamente aquellos relacionados con el metabolismo de la glucosa. La metformina es una droga estable que no se metaboliza y se excreta por orina (aproximadamente el 90% en 12 horas). Su vida media plasmática es de aproximadamente 2 a 6 hs, aunque en otros compartimentos, como en los eritrocitos y en el tracto gastrointestinal, es aún mayor, contribuyendo a una vida media más prolongada (eliminación de hasta 14 horas) [64]. Se transporta activamente al interior de las células, a través de transportadores de cationes orgánicos (OCTs) presentes en distintos tipos celulares. La difusión pasiva a través de las membranas celulares está limitada debido a su baja solubilidad en los lípidos. Los principales miembros responsables del transporte activo de metformina al interior de la célula son el OCT 1, 2 y 3. Estas proteínas se encuentran ampliamente distribuidas en los distintos tejidos [65,66]. Se ha observado la presencia de los tres transportadores (OCT1, OCT2 y OCT3) en placenta humana y en placenta y fetos de rata. En nuestro laboratorio, además, se demostró la presencia de los tres transportadores en células de granulosa de rata y en células del cúmulo humano [67].

Metformina ejerce sus acciones hipoglucemiantes a través de distintos mecanismos. En el hígado inhibe la síntesis de glucosa y de lípidos, en el músculo aumenta la sensibilidad a la insulina y en el intestino disminuye la captación de glucosa por parte de los enterocitos [68]. Todos estos efectos podrían deberse a la fosforilación y consecuente activación de la proteína quinasa activada por AMP- adenosin monofosfato (AMPK) en los distintos tipos celulares. La AMPK es una serina-treonina quinasa que actúa como un sensor de energía en las células de los mamíferos, capaz de sentir la relación AMP:ATP, siendo activada por un incremento de AMP o

una disminución de ATP. Dicha activación bloquea los procesos endergónicos (vía anabólica) y activa los procesos exergónicos (vía catabólica), regulando así la homeostasis energética [68]. Metformina puede activar de manera directa a la AMPK fosforilando su quinasa o bien de manera indirecta inhibiendo al complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial y alterando así la relación AMP/ATP [69].



**Figura 8: Enzima blanco de la metformina:** El ejercicio, el estrés, o bien, fármacos como la metformina, estimulan un aumento en la relación AMP/ATP y eso conduce a la activación de la enzima AMPK. Esta enzima favorece los procesos exergónicos e inhibe los procesos endergónicos.

Además de sus efectos en el metabolismo de la glucosa, se ha visto que metformina regula la angiogénesis en diferentes sistemas, tanto *in vivo* como *in vitro*. Su efecto en la mayoría de los casos es la disminución de la misma, principalmente debido a la inhibición de la síntesis de VEGF. Este efecto ha sido demostrado en diversos cánceres [70–73], así como también en diabetes, obesidad [74,75] y angiogénesis de retina, en donde previene el aumento de microvasos y el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos [76]. Por el contrario, en ciertas patologías metformina actúa promoviendo la angiogénesis, demostrando efectos benéficos en el tratamiento de afecciones como accidente cerebrovascular isquémico [77,78] e isquemia de extremidades después de una cirugía [79], en un modelo de ratón. En patologías reproductivas que cursan con desregulaciones angiogénicas, como PCOS [80], preeclampsia [81] o el síndrome de hiperestimulación ovárica (OHSS) [82], metformina ha sido propuesta como un posible tratamiento [81,83,84], al actuar como un fármaco regulador de la angiogénesis, capaz de aumentarla en condiciones en las que es insuficiente, o disminuirla en casos en donde se encuentra exacerbada.



# **CAPÍTULO 1:**

## **METFORMINA EN**

## **CONDICIONES FISIOLÓGICAS**

## **INTRODUCCIÓN**

Metformina ha demostrado beneficios en términos de reducción de peso corporal, efectos cardiovasculares y tasas de mortalidad en pacientes con diabetes tipo 2 (DT2) [85], sin embargo, el impacto de esta droga va más allá del metabolismo de la glucosa. El uso de metformina en el SOP, para tratar el estado de insulinoresistencia y de hiperglucemia característicos de esta enfermedad, reveló efectos en el sistema reproductor femenino, entre los cuales se encuentran una mejora en la tasa de ovulación, en la tasa de embarazos y en la de nacidos vivos [86,87]. A pesar de estas observaciones, debido a la falta de estudios específicos, el efecto de metformina en la fertilidad sigue siendo controvertido. Los metaanálisis disponibles que han evaluado su acción en el ovario han mostrado resultados diferentes entre sí. Por esta razón, en el año 2007, el grupo de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología/Sociedad Americana de Medicina Reproductiva recomendó el uso de metformina en el SOP solo en mujeres con alteraciones en el metabolismo de la glucosa y no para la inducción de la ovulación [88]. En los últimos años, sin embargo, se han encontrado nuevas evidencias sobre los posibles beneficios de metformina en el tratamiento de la fertilidad de pacientes con SOP. Varios trabajos reportan que el uso de esta droga conduce a un aumento en las tasas de ovulación y embarazo [89–92]. Otros, además, han informado un aumento en las tasas de nacidos vivos en comparación con pacientes no tratadas [25–27].

Los mecanismos a través de los cuales metformina actúa en el sistema reproductor femenino y particularmente en el ovario para mejorar la fertilidad, aún siguen siendo una incógnita. Por esta razón, en la clínica está indicado su uso solo para mejorar desbalances metabólicos en las pacientes, y no para tratar patologías reproductivas, asociadas o no a un estado de hiperglucemia. Además, como la mayoría de los estudios realizados para determinar los efectos de la droga hasta el momento han sido bajo condiciones metabólicamente patológicas, los

efectos reportados a nivel reproductivo podrían ser indirectos, relacionados con la estabilización de moléculas que señalizan en el ovario y en el útero, como por ejemplo insulina.

Poco se sabe sobre las acciones directas de metformina en el sistema reproductor femenino, y menos aún en aquellas patologías independientes del metabolismo de la glucosa.

Por otra parte, metformina también ha sido propuesta para el tratamiento de la diabetes mellitus gestacional (DMG) o la DT2 en el embarazo. La DMG es una condición metabólica que se presenta como un estado de hiperglucemia durante el embarazo, en mujeres que no tenían diabetes antes de quedar embarazadas. La etiología de la enfermedad radica en la incapacidad del páncreas materno de ajustarse al aumento de la demanda de insulina durante el embarazo.

Normalmente se resuelve después del parto, sin embargo, es esencial detectar y tratar esta patología durante el embarazo debido al impacto perjudicial que tiene tanto en la madre como en el feto, a corto y a largo plazo. Dentro de las complicaciones que puede provocar durante la gestación, se encuentran la presión arterial elevada, la necesidad de una cesárea, preeclampsia y dificultades durante el parto [93]. A largo plazo, puede reaparecer en embarazos posteriores y aumentar el riesgo de la madre de desarrollar DT2 más adelante en la vida [94,95]. Dentro de las estratégicas terapéuticas, se encuentra como primera opción la realización de un cambio en el estilo de vida de la paciente, sugiriendo modificaciones en la alimentación, un aumento del ejercicio físico y el mantenimiento de un peso corporal adecuado. Si a pesar de estos cambios, la condición se sostiene, se procede al uso de medicación, como insulina, glibenclamida o metformina. La administración de insulina es el tratamiento de primera línea, por ser una molécula natural, ya producida por la madre. Sin embargo, su utilización conlleva el riesgo de generar un estado de hipoglucemia, además de ser un tratamiento invasivo y tedioso para la paciente al implicar mediciones constantes de los niveles de glucemia que permitan ajustar la dosis administrada. Metformina, en cambio, es un hipoglucemiantre oral, de fácil

administración, con muy pocos efectos adversos, capaz de reducir la producción hepática de glucosa por el hígado y de aumentar la sensibilidad a insulina por tejidos periféricos, provocando una disminución de la glucemia. Además, es un fármaco económico que no requiere cadena de frío, lo que hace que su utilización en pacientes que viven en zonas alejadas de centros urbanos o que cuentan con bajos recursos sea más sencilla y accesible. Sin embargo, metformina atraviesa placenta, por lo que su administración y mantenimiento durante el embarazo para tratar la DMG o DT2 es controversial, ya que poco se sabe sobre los potenciales efectos adversos tanto en la madre como en el feto. Por otro lado, en mujeres con DT2 que venían tomando metformina, la interrupción del tratamiento debido al embarazo puede implicar riesgos para el manejo de la glucemia.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, podemos observar que la decisión sobre en qué casos recomendar la utilización de metformina en la clínica, queda a criterio del médico tratante, siendo en algunos casos administrada durante los primeros tres meses de gestación para disminuir la ocurrencia de abortos, y luego suspendida por el resto del embarazo.

Como se mencionó previamente, la droga es capaz de atravesar la placenta alcanzando en el feto concentraciones similares a la de la madre [96], principalmente a medida que el embarazo avanza. Trabajos previos demostraron su presencia en el cordón umbilical de madres a las que se les administró el fármaco durante el embarazo [97,98], lo que indica que es capaz de transferirse entre los compartimentos materno-infantil. Esto genera preocupación en relación a los posibles efectos adversos en varios órganos y sistemas durante el desarrollo embrionario de la descendencia expuesta a la droga. Sin embargo, los trabajos en donde se estudian los efectos en la descendencia a largo plazo son escasos, lo cual limita el uso de metformina durante el embarazo, debido a la falta de información en cuanto a su seguridad.

Como con toda droga a ser administrada durante la gestación, los primeros estudios que se

realizaron analizaron posibles efectos teratogénicos de metformina, evaluando el riesgo de anomalías congénitas en los bebés expuestos. En ninguno de estos trabajos se encontró evidencia sobre la asociación entre la exposición a la droga y el aumento del riesgo de presentar defectos al momento del nacimiento [99,100].

A continuación, debido a que la principal acción de metformina es sobre el metabolismo, los pocos trabajos que estudiaron efectos a largo plazo, se centraron en el análisis de posibles alteraciones en parámetros metabólicos de la descendencia, no habiendo hasta el momento suficientes antecedentes de estudios reproductivos en la progenie. Entre estos trabajos, se encuentran reportes de mujeres que reciben metformina debido a la presencia de obesidad o SOP, en donde no se encontraron cambios en el tamaño de los bebés. Sin embargo, se han observado menores pesos de los mismos al nacer [101,102]. Un seguimiento de los hijos de madres con SOP tratadas con la droga, reveló que a los 5-10 años, los niños tenían un índice de masa corporal más alto, una relación cintura-altura más elevada y que eran más propensos a ser obesos [103]. En otro de los estudios, se realizó un seguimiento por dos años de los niños de madres con DMG, tratadas con metformina. Los niños, que habían presentado menor peso corporal al nacimiento, a los dos años de edad tenían circunferencias mayores de la parte superior del brazo, y mayor espesor del bíceps y del pliegue cutáneo subescapular, en comparación de los hijos de madres tratadas con insulina. Sin embargo, la masa grasa corporal era igual que en los niños expuestos a insulina en el desarrollo. Esto sugiere que, aunque la concentración total de grasa es similar en los hijos de madres tratadas con metformina e insulina, metformina podría alterar la distribución de la misma [104].

Si bien el estudio de parámetros metabólicos en la progenie es de vital importancia, alteraciones a nivel reproductivo pueden traer consecuencias en la capacidad de la descendencia para lograr una gestación exitosa y el nacimiento de un bebé sano. También

pueden observarse alteraciones en el perfil hormonal, resultando en la falta de un eje endocrino saludable, que conlleve además de efectos en la fertilidad, el desarrollo de patologías más severas.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

Debido a lo expuesto, se postularon las siguientes **hipótesis**:

*« El hipoglucemiantre metformina tiene acciones directas en el sistema reproductor femenino de ratones hembra, independientemente de sus efectos en el metabolismo de la glucosa.*

*« Metformina regula procesos fundamentales para la funcionalidad ovárica y la reproducción de las hembras.*

*« La exposición a metformina in utero y durante la lactancia afecta el ovario y la fertilidad de la descendencia.*

Para ello se plantearon los siguientes **objetivos generales**:

**A.** Estudiar el efecto *in vivo* que produce el tratamiento con el hipoglucemiantre metformina sobre la funcionalidad ovárica y la reproducción en un modelo fisiológico sin patología metabólica asociada.

**B.** Analizar los efectos de la administración de metformina a madres durante la preñez y la lactancia sobre el metabolismo y la reproducción de sus crías hembra.

De acuerdo con los objetivos generales, se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

**A. Estudiar en un modelo fisiológico de hembras en edad fértil que reciben metformina:**

- El peso corporal de los animales
- El peso del tejido adiposo gonadal y mesentérico
- La concentración sérica de glucosa y su metabolización
- La concentración sérica de insulina
- Las concentraciones séricas de progesterona, estradiol y las enzimas ováricas involucradas en su síntesis
- La concentración sérica de FSH y LH
- El ciclo estral
- El desarrollo folicular
- La deposición ovárica de colágeno
- El desarrollo y la estabilidad vascular en el ovario
- Los niveles ováricos de factores angiogénicos: VEGF, ANGPT2, PDGF-BB
- La fertilidad natural y la fertilización *in vitro*

**B. Estudiar en las crías de hembras que recibieron metformina durante la preñez y la lactancia:**

- El peso corporal
- El peso del tejido adiposo gonadal y mesentérico
- La concentración sérica de glucosa y su metabolización
- La concentración sérica de progesterona y estradiol
- La concentración sérica de FSH y LH

- El ciclo estral
- El desarrollo folicular
- El desarrollo y la estabilidad vascular en el ovario
- Los niveles ováricos de factores angiogénicos: VEGF, ANGPT2, PDGF-BB
- La fertilidad natural



## Capítulo 1 A

Metformina en condiciones fisiológicas:

Animales tratados

## **METODOLOGÍA**

### **MODELO ANIMAL**

El cuidado y alojamiento de los animales se realizó en el Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME), Buenos Aires, Argentina. Se les permitió acceso *ad libitum* al alimento y al agua, y se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas.

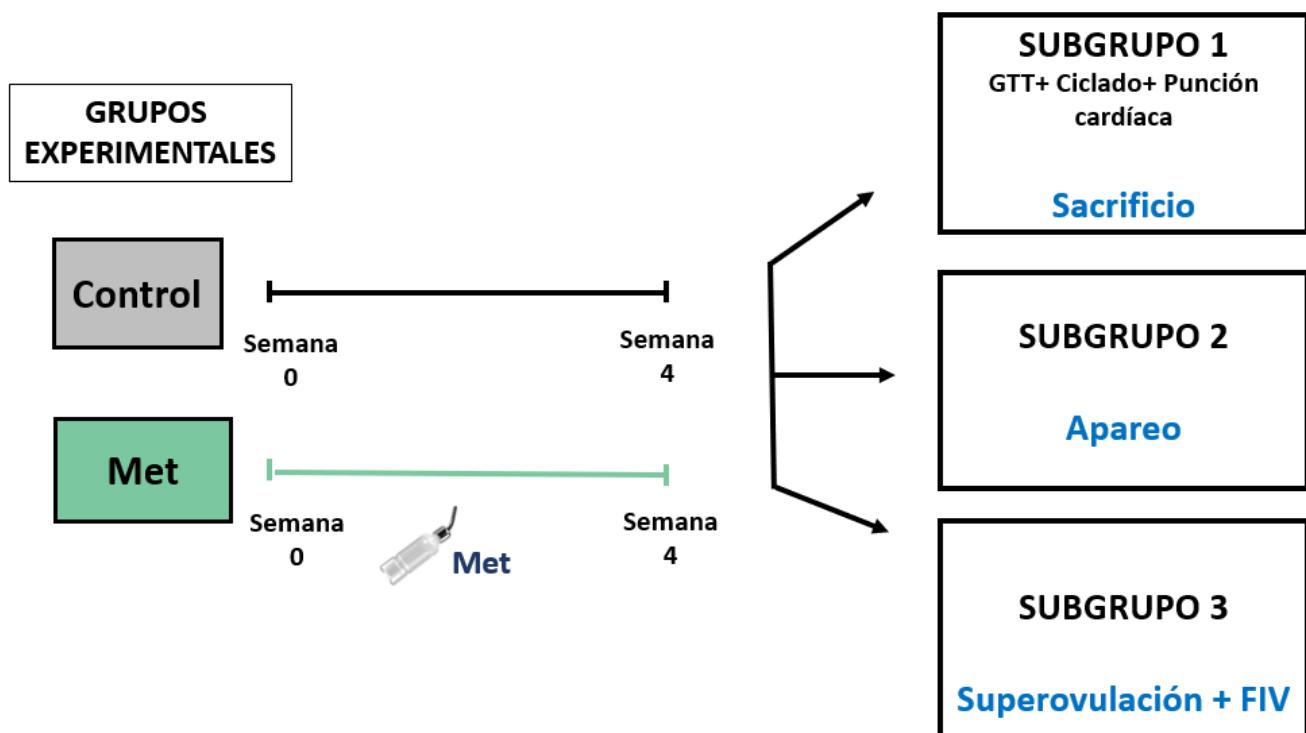
Ratones hembra C57BL/6 (de 14 semanas de edad) fueron divididos aleatoriamente en dos grupos. Uno de ellos recibió metformina (300 mg/kg, sc- 202000C, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) por vía oral, disuelta en el agua de bebida durante 4 semanas (**grupo Met**). La dosis de metformina fue equivalente a la dosis recibida por pacientes, según la conversión propuesta por Reagan-Shaw y col, que utiliza el método de normalización de la dosis según la superficie corporal [105]. La dosis se ajustó semanalmente para mantenerla constante, de acuerdo al peso corporal y al agua ingerida. El otro grupo recibió solo agua (**grupo Control**). Se monitoreó el peso corporal semanalmente. Durante las últimas dos semanas de tratamiento, se determinaron los ciclos estrales en un subconjunto de animales de cada grupo y se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa (GTT) al final del experimento. Después de 4 semanas de administración de metformina, los animales fueron divididos en 3 subgrupos.

En el primero, ratones de cada uno de los grupos experimentales que se encontraban en el estadio proestro/estro fueron anestesiados y se recolectó sangre por punción directa del corazón, previo al sacrificio. Una vez coagulada la sangre y después de la centrifugación, el suero obtenido se almacenó a -80°C. Se aislaron los tejidos adiposos mesentérico y gonadal, y se extrajeron los ovarios limpiándolos del tejido adherente. Uno de los ovarios fue congelado, mientras que el otro se fijó en solución de Bouin (Biopur Diagnostics) para ensayos posteriores.

Otro subgrupo de animales fue apareado con ratones machos C57BL/6 de fertilidad comprobada. El día 1 de preñez se determinó mediante la detección del tapón vaginal, resultado de la cópula. El tratamiento se mantuvo durante toda la preñez. Se registró el número de crías por camada y el peso corporal de las mismas.

Por último, el tercer subgrupo de animales fue sometido a una fertilización *in vitro* (FIV).

La Figura 10 muestra un diagrama esquemático del diseño experimental.



**Figura 10: Diagrama esquemático del diseño experimental.** Met: grupo metformina; GTT: Curva de tolerancia a la glucosa; FIV: Fertilización *in vitro*.

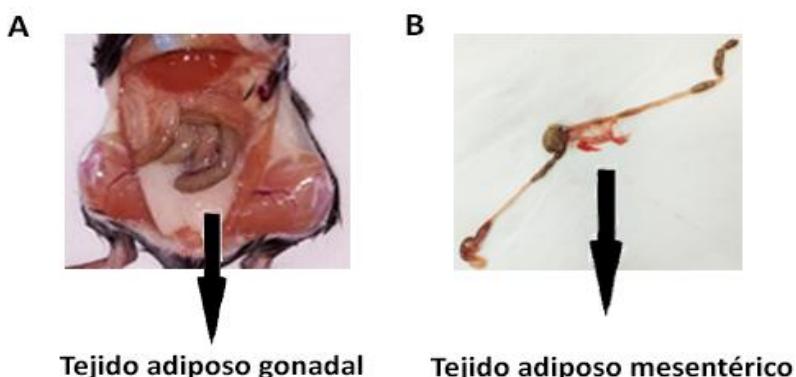
## **TÉCNICAS**

### **Análisis del ciclo estral**

Durante 14 días consecutivos, se recolectaron secreciones vaginales de cada ratón entre las 8:00 y las 9:00 a.m. Se llenó un tip de plástico limpio con 40 µL de solución fisiológica, se introdujo en la vagina del animal y se tomó una muestra. A continuación, una gota del fluido vaginal resultante se extendió en un portaobjetos de vidrio limpio. El material sin teñir se observó bajo un microscopio óptico, pudiendo reconocer tres tipos de células: células epiteliales (redondas y nucleadas), células cornificadas (irregulares, sin núcleo) y leucocitos (redondos y pequeños) (Figura 4). La proporción entre ellos se utilizó para la determinación de las fases del ciclo estral.

### **Aislamiento del tejido adiposo**

Luego del sacrificio, los animales fueron colocados en posición de decúbito dorsal y se procedió a la realización de una incisión en la línea media de la zona abdominal. Una vez retirada la piel y la pared muscular que recubre los órganos, se dejó al descubierto la cavidad abdominal. Con el objetivo de estudiar las diferencias de peso del tejido adiposo gonadal y mesentérico, se aislaron los mismos, definiendo al tejido adiposo gonadal como aquel que rodea a los ovarios, útero y vejiga (Figura 11 A); y al tejido adiposo mesentérico como aquel asociado a los intestinos (Figura 11 B) [106]. A continuación, se procedió al pesaje del mismo en balanza. .



**Figura 11: Imágenes representativas de los distintos tipos de tejido adiposo analizados.** (A) Tejido adiposo gonadal rodeando a los ovarios, útero y vejiga. (B) Tejido adiposo mesentérico rodeando a los intestinos.

### **Estudio de la morfología ovárica**

Los ovarios fueron removidos, fijados en solución Bouin (Biopur) durante 12 horas, y luego embebidos en parafina. A continuación, se montaron en portaobjetos de microscopio láminas de cinco micrómetros cortadas a intervalos de 50 micrómetros para evitar contar la misma estructura dos veces, según el método descripto por Woodruff y col. [107]. Algunos de estos portaobjetos fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina (H&E) para poder contar el número de estructuras foliculares y de cuerpos lúteos por sección de ovario, mientras que los otros se utilizaron para realizar técnicas de inmunohistoquímica.

Los folículos se clasificaron como primarios (presencia de una sola capa de células de granulosa cúbicas), preantrales (dos capas de células de granulosa cúbicas, sin antro), folículos antrales tempranos o maduros (con más de dos capas de células de granulosa cúbicas y presencia de antro, de acuerdo al tamaño), cuerpos lúteos recién formados y folículos atrésicos. Las características morfológicas de los folículos atrésicos incluyen la degeneración y desprendimiento de la capa de células de granulosa de la membrana basal, la presencia de núcleos picnóticos en este tipo celular y la degeneración del ovocito [108,109]. El porcentaje de diferentes estructuras se determinó en 4 secciones ováricas de cada ovario.

### **Tinción con colorante Picrosirius Red (PSR) y cuantificación del área fibrótica**

Las láminas desparafinadas se rehidrataron en un gradiente de etanol (100%, 90% y 70%) y se incubaron durante 40 minutos con una solución de PSR preparada disolviendo Sirius Red F3BA

(Direct Red 80, C.I.: 357.82, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en una solución acuosa saturada de ácido pícrico (Sigma-Aldrich. St. Louis, MO) al 0,1% p/v. Las láminas se lavaron tres veces en una solución de ácido acético glacial al 0,5% y luego se deshidrataron con etanol al 100%. A continuación, se procesaron al mismo tiempo para reducir la variación en la intensidad de la tinción. Las imágenes de campo claro y de luz polarizada se capturaron utilizando un microscopio Olympus, modelo IX83-DSU. El área teñida positivamente del tejido ovárico se midió utilizando el protocolo descripto en: <https://imagej.nih.gov/ij/docs/examples/stained-sections/index.html> (fecha de acceso: marzo de 2023). Se utilizó ImageJ para cuantificar el área de tinción PSR roja positiva. Para evaluar la birrefringencia de la sección ovárica teñida con Picrosirius red, se utilizó microscopía de luz polarizada circular en el mismo microscopio [110,111].

### **Fertilización *in vitro* (FIV) y desarrollo temprano de embriones**

La fertilización *in vitro* se realizó según lo descripto previamente [112]. Los espermatozoides fueron recuperados realizando una incisión en la cola del epidídimo en 300 µl de medio HTF (Irvine Scientific Inc., EE. UU.) suplementado con 0,4% (p/v) de albúmina sérica bovina (Sigma) bajo aceite de parafina (Ewe, Sanitas SA, Buenos Aires, Argentina). Se añadieron alícuotas de la suspensión a 300 µl de medio fresco para alcanzar una concentración final de  $1\text{-}10 \times 10^6$  células/ml, y los espermatozoides se incubaron durante 90 min a 37 °C en una atmósfera de 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> en aire. Las hembras de ratón de los diferentes grupos experimentales fueron superovuladas mediante una inyección intraperitoneal de eCG (7,5 UI, Syntex, Buenos Aires, Argentina) seguida de una inyección intraperitoneal de hCG (5 UI, Syntex) 48 horas después. Los complejos cúmulo-ovocitos (CCOs) se recolectaron de los oviductos 13-14 horas después de la administración de hCG y se colocaron individualmente en medio HTF bajo aceite. Los CCOs

fueron inseminados con una concentración final de  $1\text{-}5 \times 10^5$  células/ml y los gametos se co-incubaron durante 3 horas a 37 °C en una atmósfera de 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> en aire. Luego, los ovocitos fueron lavados en medio fresco para determinar el número total de ovocitos ovulados por hembra, y 15 horas después, se registró el número de embriones de 2 células. Los embriones se cultivaron en 50 µl de medio KSOM fresco [113] a 37 °C en una atmósfera de 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> en aire durante 4 días, y se determinó el porcentaje de blastocistos.

### **Inmunohistoquímica**

Las láminas de tejido fueron desparafinadas en xileno y rehidratadas utilizando lavados graduales de etanol. La actividad peroxidasa endógena fue bloqueada con peróxido de hidrógeno al 3% en PBS, y la unión no específica fue bloqueada con suero bovino al 2% durante 20 minutos. Las secciones fueron incubadas con anticuerpos monoclonales de ratón anti-α-actina de células musculares lisas (Ab18147, 1:100; Abcam, Inc.) o de conejo anti-CD34 (sc74499, 1:100; Santa Cruz) o anti-AMH (Ab24542; 1:200; Abcam, Inc) durante la noche a 4 °C. Después de los lavados, los cortes fueron incubados con anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón o de conejo biotinilados (BA-9200; Vectorlabs) y luego con complejo de peroxidasa conjugada a biotina-avidina (sistema Vectastain ABC; Vector Laboratories) durante 30 minutos. La expresión de proteínas se visualizó utilizando tinción con diaminobencidina (catálogo 11718096001; Roche). La reacción se detuvo con agua destilada, y luego los cortes se tiñeron con hematoxilina y se deshidrataron antes de montarse con medio de montaje (Canada Balsam Synthetic; Biopack). La tinción marrón se consideró positiva.

Las imágenes se digitalizaron utilizando una cámara (Nikon) montada en un microscopio de luz convencional (Nikon). Finalmente, las imágenes se convirtieron al formato TIFF (escala de nivel de gris) para su análisis.

Para la cuantificación de las áreas endoteliales y periendoteliales de los vasos se utilizó el programa Image Pro Plus 3.0 (Media Cybernetics). Las áreas fueron determinadas en 4 secciones por ovario. Solo se tomaron en cuenta folículos y estroma para el conteo entre grupos. Las microfotografías fueron analizadas por un observador ciego al tipo de tratamiento. Se consideraron como folículos AMH positivos aquellos que tenían un 80% de las células de la granulosa marcadas. Para el conteo no se tuvieron en cuenta los cuerpos lúteos ni los folículos atrésicos.

### **Western blot**

Los ovarios fueron congelados a -80 °C hasta la extracción de proteínas y luego resuspendidos en buffer lisis (20 mM Tris-HCl [pH = 8], 137 mM NaCl, 1% Nonidet- P40 y 10% glicerol) suplementado con inhibidores de proteasas (0.5 mM fenilmetilsulfonil fluoruro, 0.025 mM N-CBZ-L-fenilalanina clorometil cetona, 0.025 mM N-p-tosil-lisina clorometil cetona y 0.025 mM L-1-tosilamida-2-fenil-etilclorometil cetona) e inhibidores de fosfatasa (25 mM fluoruro de sodio, 0.2 mM ortovanadato de sodio y 10 mM glicerofosfato). Los lisados fueron homogeneizados con un homogeneizador Ultra-Turrax (IKA-Werke GmbH & Co). Las muestras fueron centrifugadas a 4 °C durante 10 min a 10,000×g y el sobrenadante resultante fue almacenado. La concentración de proteínas se midió utilizando el ensayo de Bradford (Bradford, 1976). Después de hervir durante 5 min, se sembraron 20 µg de proteína en un gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio al 10%-12%, y la electroforesis se realizó a 150 V durante 1.5 h. Las proteínas resultantes fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa durante 2 hs. La membrana fue preincubada con un buffer de bloqueo (2% BSA y 0.1% en solución salina tamponada con Tris 20 mM [4 mM Tris-HCl y 100 mM NaCl; pH 8]) durante 1 h a temperatura ambiente e incubada con los anticuerpos primarios apropiados: StAR (sc25806,

1:1000; Santa Cruz); CD34 (sc74499, 1:100; Santa Cruz); anticuerpo monoclonal anti-  $\alpha$ -actina de células musculares lisas (Ab, 18147, 1:1000; Abcam, Inc);  $\gamma$ H2AX (ab26350, 1:1000; Abcam); 3 $\beta$  HSD (sc515120, 1:500; Santa Cruz); VEGF (ab46154, 1:500; Abcam); PDGFB (LS-C331340, 1:500; LSBio), Angiopoyetina-2 (ab155106, 1:500, abcam), GAPDH (14c10, 1:5000, Cell Signaling);  $\beta$ -Actina (sc1616, 1:5000, Santa Cruz); Aromatasa (LS-C801343, 1:500, LS Bio), en 0.1% Tween 20 en solución salina en Tris 20 mM [4 mM Tris-HCl y 100 mM NaCl; pH 8] durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, las membranas fueron incubadas con anticuerpos secundarios anti-conejo (PI-1000, 1:1000; Vector Laboratories) o anti-ratón (HAF007, 1:1000; R&D Systems) conjugados con peroxidasa. Por último, la detección fue realizada por quimioluminiscencia con un equipo G-box (GeneSnap Versión 7.12.01). Los niveles de proteína fueron analizados por densitometría utilizando Scion Image for Windows (Scion Corporation, Worman's Mill, CT, USA). Las bandas de  $\beta$ -actina o GAPDH se utilizaron como control interno. Los datos de densidad óptica se expresan en unidades arbitrarias  $\pm$  SEM.

### **Parámetros metabólicos**

La glucemia se midió utilizando un medidor de glucosa OneTouch Ultramini (Lifescan) a partir de sangre de la cola de los animales después de 6 horas de ayuno. Para el análisis de la Prueba de Tolerancia a la Glucosa (GTT, por sus siglas en inglés), se midió la glucemia basal y luego se administró una inyección intraperitoneal de 2 g de glucosa/kg a los ratones. Se realizaron mediciones adicionales después de 15, 30, 60, 90 y 120 minutos y luego se calculó el área bajo la curva.

Los niveles de insulina en suero se midieron utilizando un Kit de ELISA de Insulina para Ratones Ultra Sensible (Crystal Chem; Catálogo #90080) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### **Parámetros hormonales**

La progesterona y el estradiol en suero se cuantificaron utilizando un kit de inmunoensayo quimioluminiscente *in vitro* (MAGLUMI; Snibe Diagnostic) y el analizador de inmunoensayo quimioluminiscente totalmente automático de la serie MAGLUMI, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La FSH y la LH se midieron utilizando kits de ELISA (Abbexa, catálogo #abx154038 y #abx575729, respectivamente) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software estadístico Prism v6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.). Los datos se expresaron como la media ± SEM. La normalidad se probó con una prueba de Kolmogorov-Smirnov. Luego, las diferencias significativas se analizaron con un T-test no pareado o con la prueba de Mann-Whitney, según la normalidad.

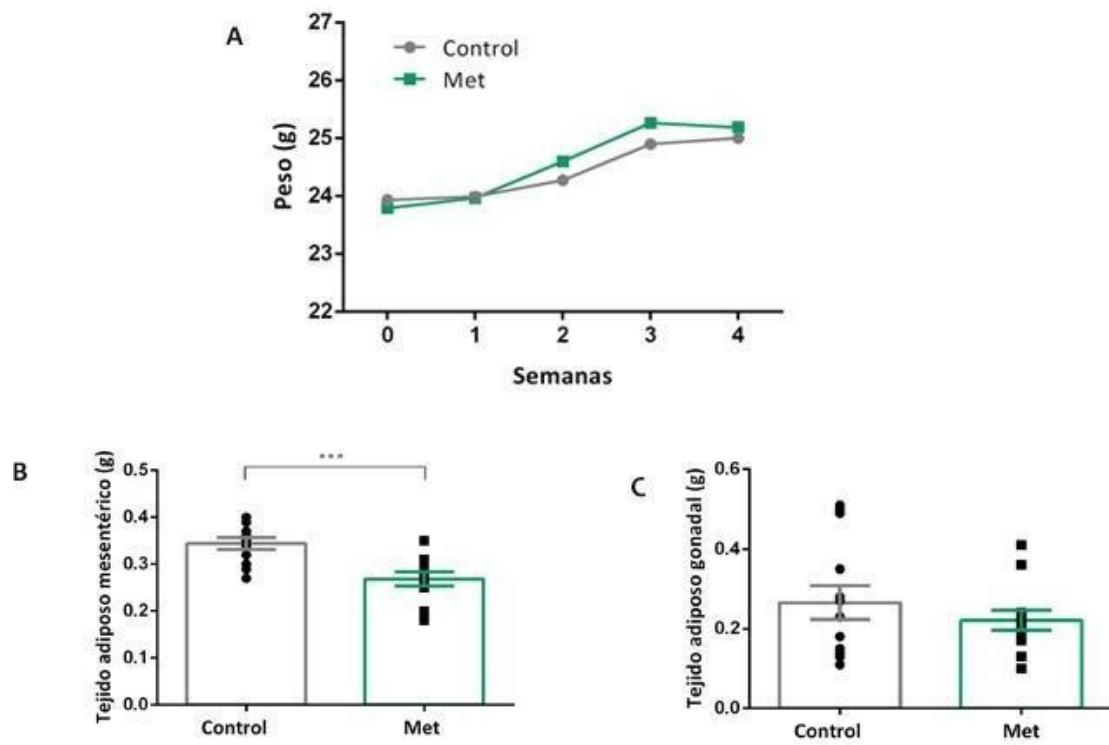
La significancia estadística se definió como  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

### **Efecto de metformina sobre parámetros metabólicos**

Para caracterizar los efectos de la administración de metformina sobre el metabolismo, se realizaron las mediciones semanales del peso corporal de los animales (n=17-23). No se observaron diferencias significativas en el peso corporal en comparación con los animales control (Figura 11 A). Después de la eutanasia, observamos que el tejido adiposo mesentérico se redujo en el grupo metformina ( $p < 0,001$ ) (n=12), sin diferencias en el tejido adiposo gonadal ( $p > 0,05$ ) (Figura 11 B-C) (n=12-13).

Se estudió la glucemia basal y su metabolización mediante una Prueba de Tolerancia a la Glucosa (GTT) (n=6-8). No se encontraron diferencias en los niveles basales de glucosa en sangre ni en el área bajo la curva de glucosa entre los grupos ( $p > 0,05$ ) (Tabla 1). Los animales tratados con metformina también presentaron niveles de insulina similares al grupo control ( $p > 0,05$ ) (Tabla 1) (n=6-7).



**Figura 11. Peso corporal y tejido adiposo en los grupos control y metformina.** (A) Curva de peso corporal durante las 4 semanas del tratamiento con metformina. (B) Peso del tejido adiposo mesentérico. (C) Peso del tejido adiposo gonadal. Los datos se expresan como la media ± el error estándar de la media (SEM). \*\*\*p <0,001.

**Tabla 1:** Parámetros metabólicos y hormonales de ratones control y metformina al finalizar el experimento.

	Control	Metformina
<b>Glucemia (mg/dL)</b>	139.40 ± 10.22	154.20 ± 2.67
<b>ABC (min*mg/dL)</b>	22800 ± 1026	23465 ± 641
<b>Insulina (ng/mL)</b>	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.02
<b>Estradiol (pg/mL)</b>	81.17 ± 4.78 <sup>a</sup>	102.50 ± 7.56 <sup>b</sup>
<b>Progesterona (ng/mL)</b>	7.75 ± 0.75 <sup>a</sup>	4.35 ± 0.77 <sup>b</sup>
<b>LH (ng/mL)</b>	16.24 ± 2.14	18.86 ± 1.31
<b>FSH (ng/mL)</b>	141.10 ± 10.83	172.80 ± 19.96

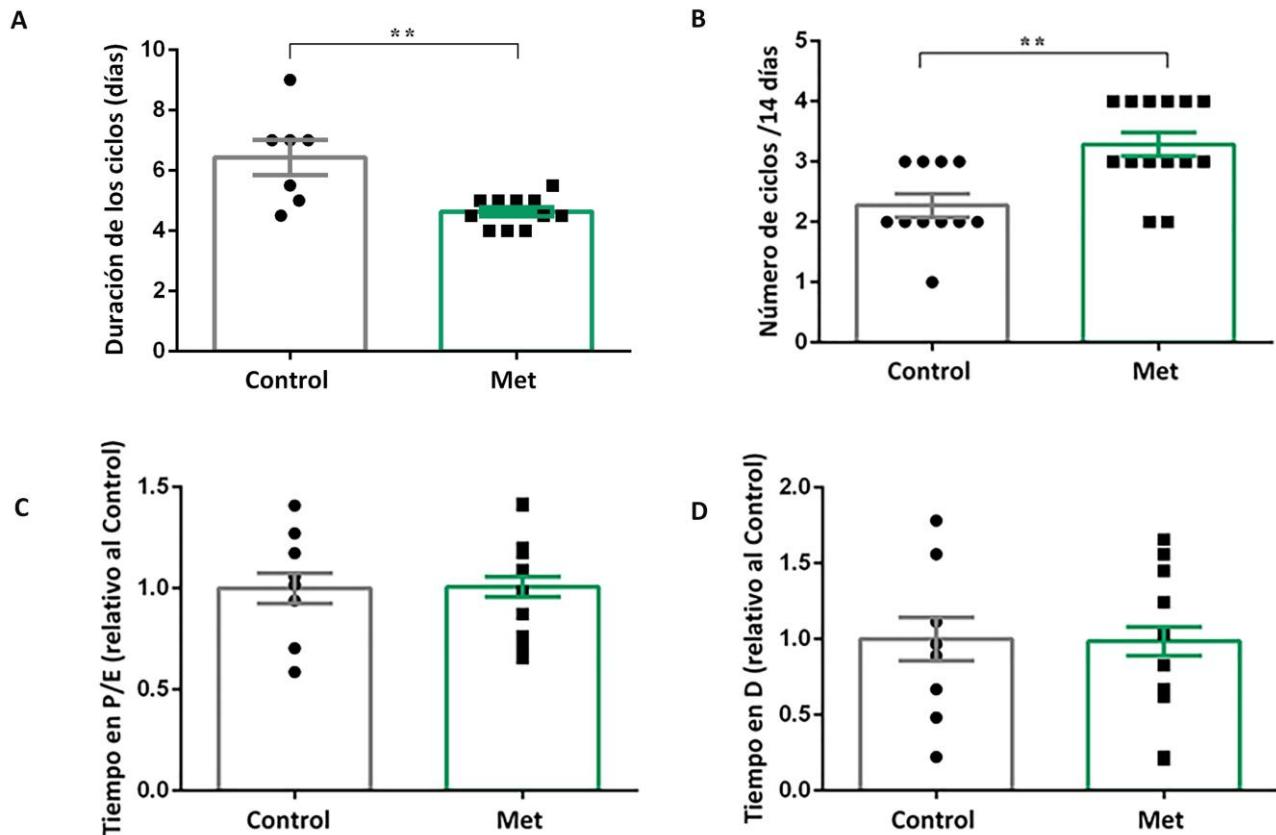
Los datos están expresados como la media ± SEM. Se utilizó T-test para realizar comparaciones entre grupos. ABC: Área bajo la curva de glucosa. Se definieron diferencias significativas como p<0,05.

### Efecto de metformina en el ciclo estral y las hormonas ováricas

A continuación, nuestro objetivo fue analizar si el tratamiento con metformina causaba alguna alteración en el ciclo estral. Analizamos el número ( $n=11-14$ ) y la duración de los ciclos ( $n=7-11$ ) y encontramos que los animales tratados tuvieron ciclos más cortos que los de los animales control, lo que llevó a un mayor número total de ciclos en el período analizado ( $p < 0,01$ ) (Figura 12 A-B). No se encontraron diferencias en la proporción de tiempo que los animales pasaron en cada etapa del ciclo ( $n=11-20$ ) (Figura 12 C-D).

Para estudiar si el tratamiento con metformina podría alterar la producción hormonal, medimos los niveles séricos de FSH ( $n=9-10$ ), LH ( $n=9$ ), progesterona ( $n=6-10$ ) y estradiol ( $n=5-6$ ). Los animales tratados con metformina mostraron concentraciones elevadas de estradiol ( $p < 0,05$ ) y concentraciones reducidas de progesterona ( $p < 0,05$ ) (Tabla 1).

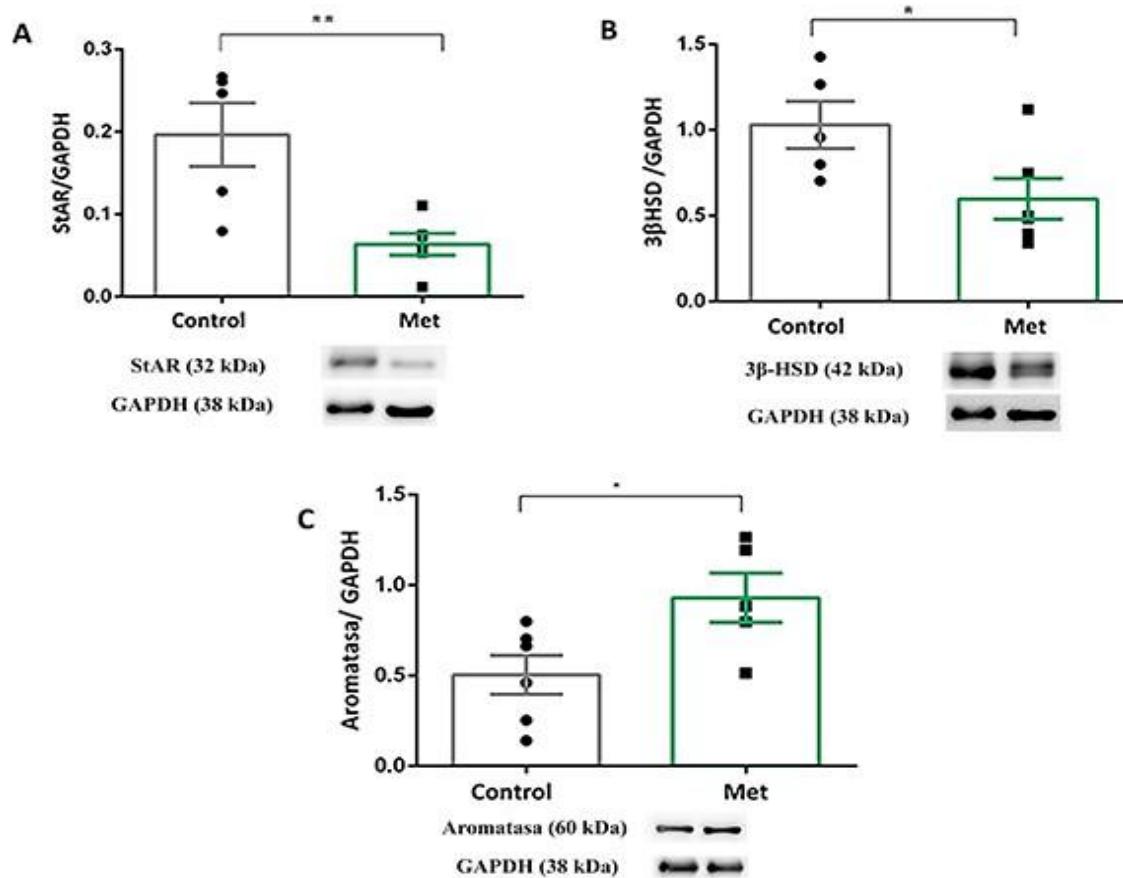
No se encontraron diferencias en los niveles de FSH o LH entre los grupos ( $p > 0,05$ ) (Tabla 1).



**Figura 12. Efecto del tratamiento con metformina en el ciclo estral.** (A) Duración de los ciclos. (B) Número de ciclos en 14 días. (C) Tiempo transcurrido en las fases Proestro y Estro en relación con el grupo control. (D) Tiempo transcurrido en las fases Diestro I y Diestro II en relación con el grupo control. Los datos se expresan como la media ± el error estándar de la media (SEM). \*\*p <0,01.

### Efecto de metformina en la expresión de proteínas esteroidogénicas

Dado que la producción de estradiol y progesterona se vio alterada, analizamos la concentración ovárica de las proteínas StAR ( $n=5-6$ ),  $3\beta$ HSD ( $n=5-6$ ) y aromatasa ( $n=5-6$ ). Encontramos que los niveles de StAR ( $p < 0,01$ ) y  $3\beta$ HSD ( $p < 0,05$ ) se encontraban disminuidos, y que los niveles de aromatasa se encontraban aumentados en los animales tratados con metformina en comparación con los animales control ( $p < 0,05$ ) (Figura 13 A-C).

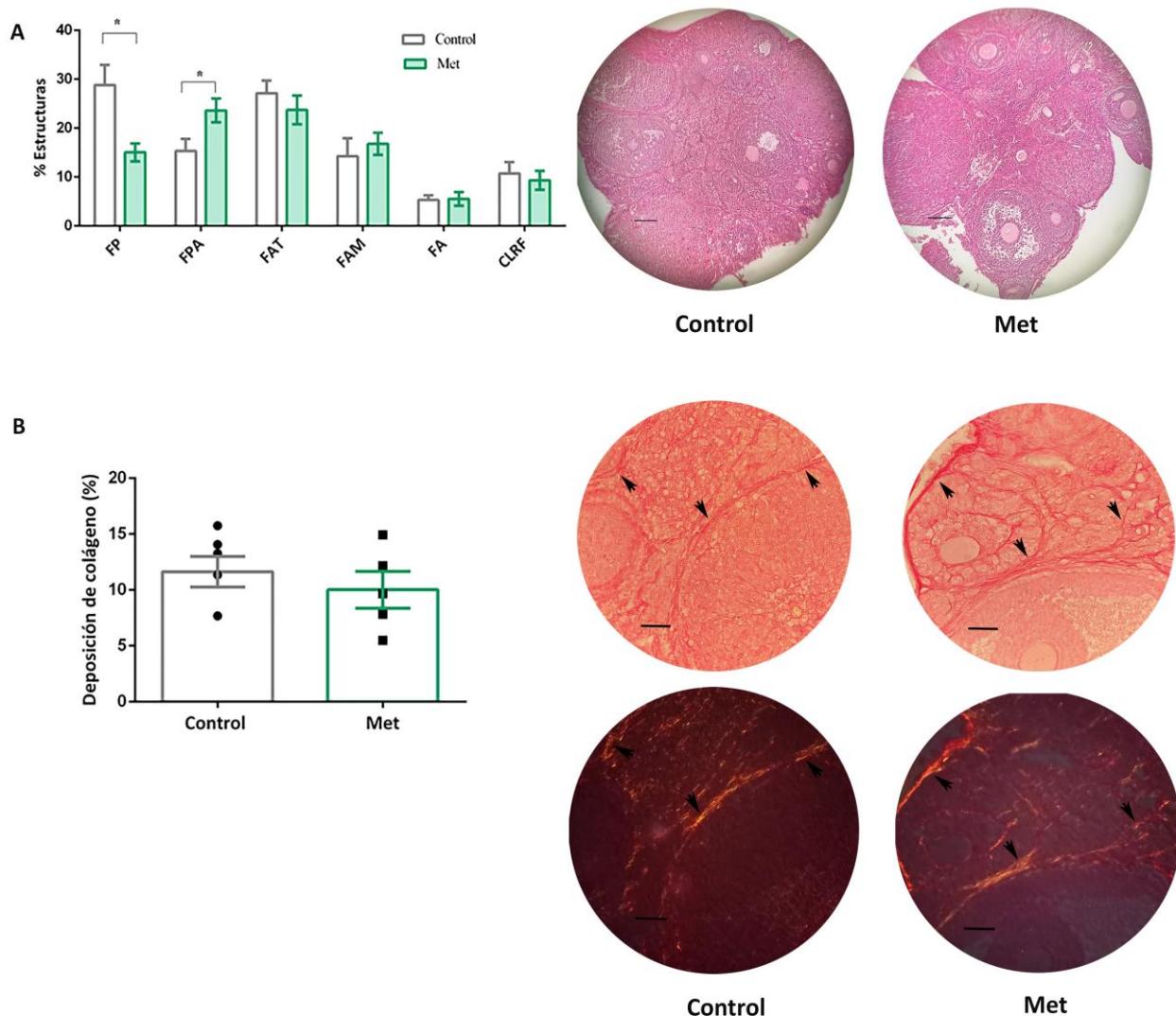


**Figura 13. Expresión de proteínas esteroidogénicas en los grupos control y metformina.** (A) StAR.  
(B) 3 $\beta$ HSD. (C) Aromatasa. La densidad de cada banda se normalizó a las bandas de GAPDH. Los paneles inferiores muestran bandas representativas de cada proteína analizada. Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

### **Efecto de metformina en el desarrollo folicular y la fibrosis ovárica**

Como se muestra en la Figura 14 A, determinamos el porcentaje de estructuras en cada estadio folicular en secciones histológicas teñidas con Hematoxilina-Eosina ( $n=6-9$ ). Metformina disminuyó el porcentaje de folículos primarios y aumentó el porcentaje de folículos preantrales en comparación con el grupo control ( $p < 0,05$ ). No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de otros estadios foliculares ( $p > 0,05$ ). El número total de estructuras permaneció inalterado entre los grupos (Control:  $48,67 \pm 6,28$  ; Met:  $52,50 \pm 7,34$ ) ( $p > 0,05$ ).

Dado que la fibrosis puede alterar la arquitectura y la función del tejido ovárico, utilizamos Picrosirius Red (PSR) para evaluar el posible efecto de metformina ( $n=5-6$ ). La fibrosis ovárica medida mediante tinción con PSR fue similar entre los grupos ( $p > 0,05$ ) (Figura 14 B).

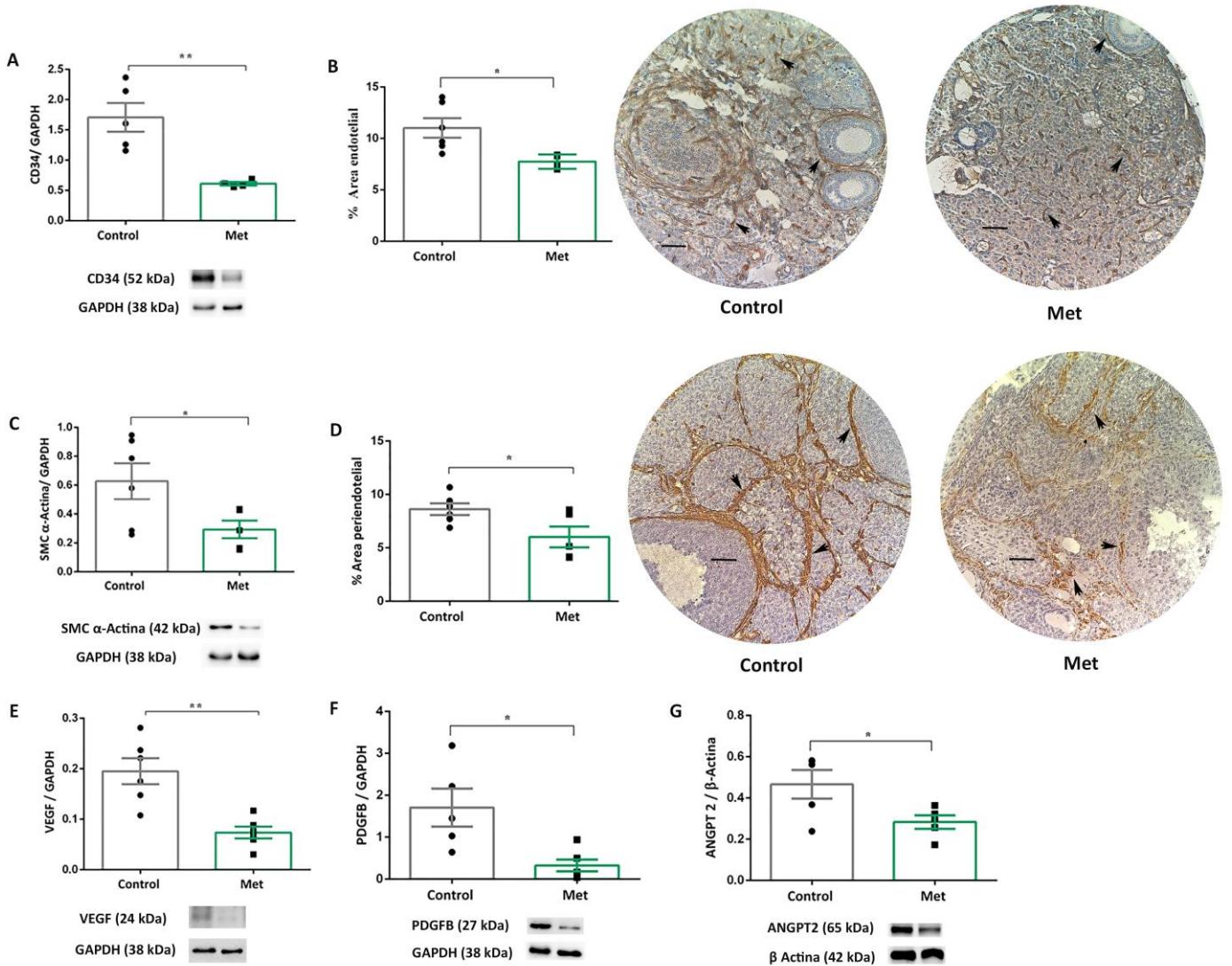


**Figura 14. Efecto del tratamiento con metformina en el desarrollo folicular y la fibrosis ovárica. (A)**

Porcentaje de cada estructura en secciones ováricas teñidas con H&E. FP: Folículo primario. FPA: Folículo preantral. FAT: Folículo antral temprano. FAM: Folículo antral maduro. FA: Folículo atrésico. CLRF: Cuerpo lúteo recientemente formado. Barra de escala, 100 µm. \*p < 0,05. (B) Deposición de colágeno analizada mediante PSR. El gráfico muestra el % de área teñida. Los paneles de la derecha muestran imágenes representativas de PSR en campo claro (arriba) y microscopía de luz polarizada (abajo) de ambos grupos experimentales. Las cabezas de flecha muestran tinción positiva con PSR. Barra de escala: 50 µm; magnificación 600X.

### **Efecto de metformina en la densidad y estabilidad vascular**

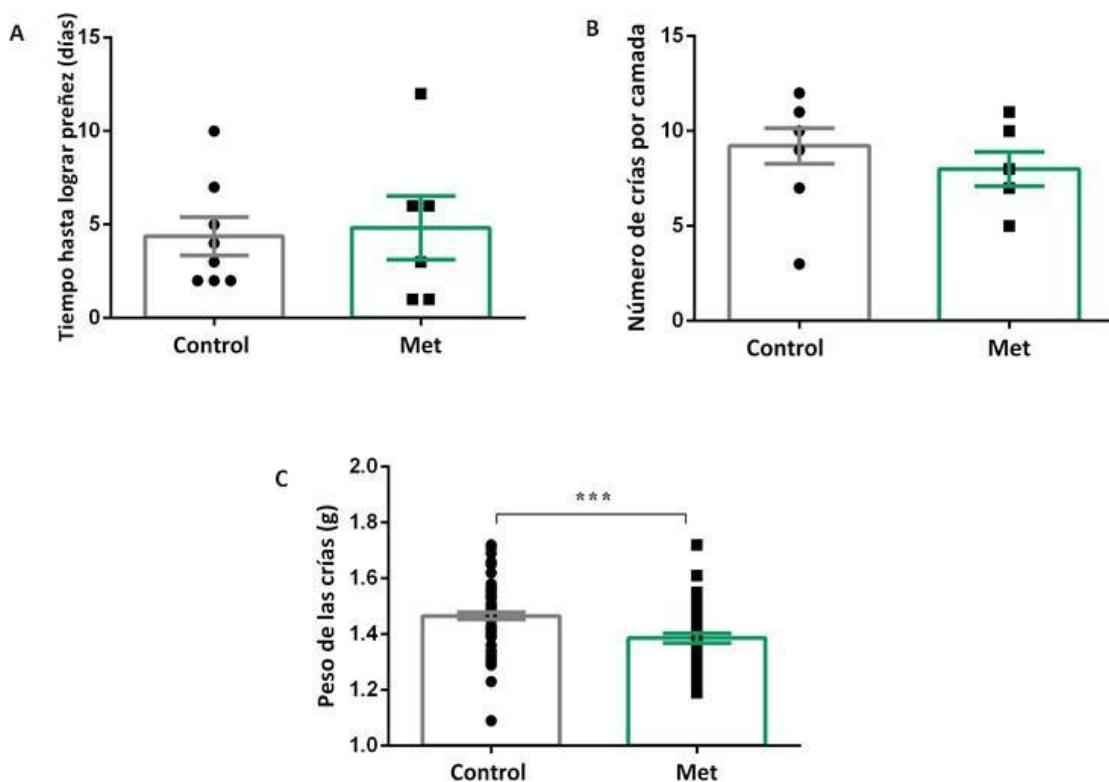
Considerando que la calidad del ovocito depende en gran medida de un desarrollo vascular adecuado, evaluamos si el tratamiento con metformina afectaba la formación y estabilidad del sistema vascular. En primer lugar, analizamos por inmunohistoquímica las proteínas CD34 (n=5-6) y  $\alpha$ -SMA (n=5-6), marcadores de células endoteliales y periendoteliales vasculares (pericitos y células musculares lisas), respectivamente. Observamos que los ratones tratados con metformina tenían una menor expresión de CD34 en comparación con los ratones control ( $p < 0,001$ ) (Figura 15 B), y que, además, metformina disminuyó las células  $\alpha$ -SMA positivas en el ovario ( $p < 0,05$ ) (Figura 15 D). Estos resultados fueron corroborados, en ambos casos, mediante western blot (n=5-6) ( $p < 0,05$ ) (Figura 15 A y C). Luego, estudiamos el principal factor angiogénico: VEGF (n=6). La expresión de la proteína VEGF fue menor en el grupo metformina ( $p < 0,01$ ) (Figura 15 E). Por último, analizamos los niveles de dos factores angiogénicos involucrados en la estabilidad de los vasos sanguíneos: PDGF-B (n=5-6) (Figura 15 F) y angiopoyetina-2 (ANGPT-2) (n=5) (Figura 15 G). El tratamiento con metformina redujo la expresión de ambas proteínas ( $p < 0,05$ ).



**Figura 15. Angiogénesis ovárica en los grupos control y metformina.** (A) CD34. (B) Inmunotinción de células endoteliales con anticuerpo anti-CD34. (C) SMC- $\alpha$ -actina. (D) Inmunotinción de células periendoeliales con anticuerpo SMC- $\alpha$ -actina. Para las immunohistoquímicas, se analizaron cuatro secciones por ovario. Las fotos muestran secciones histológicas representativas de los ovarios. Barra de escala: 50  $\mu$ m; magnificación 600X. Las cabezas de flecha muestran inmunotinción positiva. (E) VEGF. (F) PDGFB. (G) ANGPT2. Para los western blots, la densidad de cada banda se normalizó a las bandas de GAPDH o  $\beta$ -Actina. Los paneles inferiores muestran bandas representativas de cada proteína analizada. Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). \*p < 0,05, \*\*p < 0,01.

### Efecto de metformina en parámetros de fertilidad

Para evaluar el efecto de la administración de metformina en el rendimiento reproductivo de los ratones, apareamos hembras con machos C57BL/6 de fertilidad comprobada. No se encontraron cambios en el tiempo que demoraron los animales en lograr la preñez ( $n=6-8$ ) ni en el número de crías por camada ( $n=6-9$ ) ( $p > 0,05$ ) (Figura 16 A-B). Sin embargo, las crías de animales tratados con metformina mostraron un menor peso al nacer ( $n=40-80$ ) ( $p < 0,001$ ) (Figura 16 C). La duración de la preñez no cambió entre los grupos.



**Figura 16. Efecto del tratamiento con metformina sobre la fertilidad natural.** (A) Tiempo hasta lograr preñez. (B) Número de crías por camada. (C) Peso de las crías. Los datos se expresan como la media ± el error estándar de la media (SEM). \*\*\* $p < 0,01$ .

### **Efecto de metformina en la calidad ovocitaria y la fertilización *in vitro* (FIV)**

Por último, analizamos el efecto de metformina en la fertilización *in vitro*. No se encontraron diferencias en el número de ovocitos recuperados, el porcentaje de ovocitos normales y anormales, embriones de dos células y la formación de blastocistos ( $n=5$ ) ( $p > 0,05$ ) (Tabla 2).

**Tabla 2:** Fertilización *in vitro* del grupo control y metformina.

	<b>Control</b>	<b>Metformin</b>
<b>Número de ovocitos recuperados</b>	$28.0 \pm 0.7$	$30.4 \pm 1.6$
<b>% Ovocitos normales</b>	$84.9 \pm 4.6$	$89.5 \pm 5.1$
<b>% Embriones de dos células</b>	$65.9 \pm 10.2$	$69.2 \pm 6.0$
<b>% Blastocistos</b>	$88.5 \pm 3.9$	$95.2 \pm 2.6$

Los datos están expresados como la media  $\pm$  SEM. Se utilizó T-test para realizar comparaciones entre grupos. El porcentaje de ovocitos normales fue calculado sobre la cantidad de ovocitos recuperados. El porcentaje de embriones de dos células fue calculado sobre la cantidad de ovocitos normales. El porcentaje de blastocistos fue calculado sobre la cantidad de embriones de dos células. Diferencias significativas fueron definidas como  $p < 0,05$ .

## **DISCUSIÓN**

La gestión de la fertilidad en patologías metabólicas en mujeres, como el síndrome de ovario poliquístico (SOP), plantea un desafío médico significativo. La metformina, un fármaco hipoglucemiante ampliamente utilizado, ha surgido en los últimos años como un tratamiento para las alteraciones en el metabolismo de la glucosa en mujeres con SOP, lo que resulta en una mejora en la fertilidad y la glucemia [86]. Así, el uso de metformina para mejorar la fertilidad en mujeres en patologías como SOP, obesidad o DT2 ha comenzado a considerarse. Los posibles beneficios para la fertilidad podrían derivar no solo de un perfil metabólico mejorado, sino también de otros efectos de la droga en el tracto reproductivo. Investigaciones previas, incluidas las nuestras, han demostrado que metformina puede actuar directamente sobre las células ováricas, activando AMPK [67,114–116]. Además, regula la expresión de VEGF en células de la granulosa *in vitro* [67]. Sin embargo, los estudios *in vivo* que evalúan los efectos de la metformina en el ovario, independientemente de los efectos metabólicos y sistémicos, son escasos. Nuestro estudio revela que metformina puede influir en la función ovárica, afectando el ciclo estral, el desarrollo folicular, la esteroidogénesis y la angiogénesis en ratones sanos. Sin embargo, la administración de metformina no alteró la fertilidad natural ni la ovulación inducida hormonalmente.

Primero analizamos parámetros metabólicos en ambos grupos de animales para evaluar posibles acciones metabólicas de metformina en ratones no hiperglucémicos. Aunque este medicamento no afectó el peso corporal, la glucosa en sangre en ayunas, la prueba de tolerancia a la glucosa o los niveles de insulina, sí redujo el tejido adiposo mesentérico en comparación con los ratones no tratados, lo que indica la capacidad de metformina de mitigar la deposición de tejido adiposo incluso en animales sin anomalías metabólicas. Esto concuerda con numerosos estudios previos que han reportado una reducción en la deposición de tejido

adiposo en humanos [117] y en modelos animales [114,115][118,119].

El ciclo ovárico refleja la capacidad de las hembras para alternar entre una fase receptiva y una no receptiva, permitiendo el logro de la preñez después del apareamiento. Los animales que recibieron metformina, a pesar de tener ciclos más cortos, pasaron el mismo porcentaje de tiempo en las etapas ovulatorias y anovulatorias que los animales no tratados. Dado que el ciclo estral está regulado por hormonas hipofisarias y ováricas, evaluamos si estas moléculas estaban involucradas en los cambios observados. No hubo variaciones significativas en los niveles séricos de gonadotrofinas entre los grupos. Sin embargo, metformina aumentó los niveles séricos de estradiol y disminuyó los niveles de progesterona. Este cambio hormonal no afectó el porcentaje de cuerpos lúteos, lo cual sugiere que la disminución de progesterona se debe más probablemente a una menor síntesis, que a una disminución en la ovulación o en la formación de cuerpos lúteos. Al analizar las proteínas esteroidogénicas encontramos una disminución en StAR y 3 $\beta$ -HSD en los ovarios de ratones tratados con metformina, correlacionando con la reducción de los niveles séricos de progesterona, y un aumento de aromatasa, lo cual explicaría las mayores concentraciones de estradiol en sangre. En conjunto, estos resultados podrían indicar que metformina actúa sobre las células ováricas, afectando la producción de hormonas esteroideas e induciendo modificaciones en el ciclo estral, independientemente de la presencia de disfunción metabólica sistémica. Es probable que metformina, al menos a esta dosis y duración del tratamiento, no tenga efectos en la hipófisis con respecto a la secreción de gonadotrofinas.

A continuación, realizamos estudios histológicos en el ovario y encontramos que metformina induce cambios en el desarrollo folicular temprano. Los animales tratados con metformina mostraron un menor porcentaje de folículos primarios y un mayor porcentaje de preantrales, sugiriendo una promoción del crecimiento de folículos primarios al estadio secundario. La

regulación del desarrollo folicular temprano involucra una compleja interacción de factores endócrinos, parácrinos y autócrinos, lo que motiva una mayor investigación sobre los mecanismos reguladores de metformina. Contrariamente, el tratamiento con la droga no afecta los estadios antrales de la foliculogénesis, la atresia ni el porcentaje de cuerpos lúteos. Estos estadios, a diferencia de los estadios tempranos de la foliculogénesis, están regulados principalmente por gonadotrofinas. Dado que los niveles de gonadotrofinas son similares entre los animales de ambos grupos, es esperable que la proporción de folículos cuyo crecimiento depende de éstas, se vea inalterada.

Si bien metformina muestra eficacia en la prevención de la fibrosis [120], no afecta la fibrosis ovárica en ovarios sanos, indicando que la inflamación en el órgano no se ve afectada por el tratamiento con la droga.

Por otra parte, como se mencionó anteriormente, metformina tiene muchos efectos bien probados sobre la angiogénesis en diferentes sistemas, tanto *in vivo* como *in vitro* [67,80,121–124]. En el presente trabajo, encontramos una reducción en la angiogénesis en los ovarios después del tratamiento *in vivo* con metformina, incluso en ausencia de condiciones patológicas; y una disminución en los factores angiogénicos relacionados al endotelio y periendotelio, VEGF, PDGFB y ANGPT2. Anteriormente, en nuestro laboratorio, comprobamos que en un modelo de rata con SOP metformina pudo revertir el aumento en la angiogénesis ovárica [83], además de disminuir la expresión de VEGF en un cultivo celular primario de granulosa de rata [67]. En este trabajo, corroboramos este último hallazgo, utilizando un modelo de ratones *in vivo* de animales saludables. Coincidientemente, estudios previos encontraron que metformina fue capaz de revertir el aumento en la angiogénesis en diferentes tipos de cáncer [125–128], así como en modelos animales de obesidad [75] y angiogénesis retiniana anormal [76]. En este modelo encontramos que el tratamiento con la droga disminuye

la angiogénesis en un contexto ovárico saludable, a diferencia de otros procesos, como la fibrosis, la foliculogénesis tardía o la ovulación, donde metformina tiene efectos principalmente frente a una alteración [83,129,130]. Teniendo en cuenta nuestros resultados, sería interesante realizar estudios adicionales en mujeres para determinar si metformina puede reducir la angiogénesis ovárica, de modo de poder aprovechar este efecto en patologías con un crecimiento excesivo de vasos sanguíneos, como SOP, OHSS o cáncer.

En cuanto a la fertilidad, metformina no tuvo efectos ni en la fertilidad natural ni en la ovulación inducida hormonalmente. Al realizar la inducción de la ovulación seguida de fertilización *in vitro* en hembras de ambos grupos experimentales, no se observaron alteraciones en ninguno de los parámetros medidos. Por otro lado, cuando apareamos las hembras sin estimular con machos de fertilidad comprobada, encontramos que el tiempo hasta lograr la preñez y el número de crías por camada no cambiaron entre los grupos. Sin embargo, las crías presentaron un menor peso al nacer cuando las madres recibieron el tratamiento con metformina antes y durante la preñez. En los últimos años, metformina comenzó a proponerse como tratamiento para las mujeres embarazadas con patologías relacionadas al metabolismo de la glucosa, como la DT2 o la DMG. Sin embargo, la seguridad de metformina, especialmente en relación con los efectos a largo plazo en la descendencia, sigue sin estar completamente demostrada. En trabajos previos, se evaluó el peso al nacer de los hijos de madres con DMG tratadas con insulina o metformina y se obtuvieron resultados controvertidos. Por ejemplo, en un metanálisis realizado por Guo y col, los recién nacidos expuestos *in utero* a metformina fueron más livianos que aquellos expuestos a insulina [131]. El estudio MiTy encontró una disminución en el peso al nacer en recién nacidos expuestos a terapia combinada en comparación con metformina o insulina sola [101]. Por el contrario, Ainuddin y col. no encontraron diferencias en el peso al nacer entre los grupos cuando las madres con DMG fueron expuestas solo a metformina, insulina o un

tratamiento combinado [132]. Los datos de madres con SOP tratadas con metformina durante el embarazo no muestran diferencia en el peso de la descendencia al nacer, en comparación con madres no tratadas [133,134]. Nuestro estudio en ratones sanos tratados con metformina durante la preñez tiene la ventaja de aislar posibles factores de confusión como diferencias debido a las distintas patologías de la madre. En esta condición, el peso al nacer disminuye en las crías de ratones expuestos a metformina durante toda la preñez, lo que sugiere que, bajo condiciones normales, la administración de metformina reduce el peso al nacer de las crías de madres tratadas.

En conclusión, metformina influye en la función ovárica en condiciones saludables, independientemente de los efectos en el metabolismo de la glucosa. Los efectos incluyen patrones alterados de síntesis de estradiol y progesterona, modificaciones en el ciclo estral y cambios en los vasos sanguíneos ováricos. También encontramos un cambio en la proporción de folículos pequeños en el ovario, que crecen independientemente de las gonadotrofinas. A pesar de estas alteraciones observadas, la fertilidad permanece intacta en estos animales, tanto cuando se produce de forma natural como de forma inducida por gonadotrofinas.

Aislar los efectos de la metformina en el ovario de otras condiciones como la hiperglucemia, el hiperandrogenismo u otros, es crucial para comprender mejor los mecanismos de esta droga sobre la reproducción y la fertilidad. Esto permitirá a los investigadores y médicos evaluar el uso de metformina en mujeres que necesitan tratamientos de fertilidad más allá de sus indicaciones actuales como fármaco hipoglucemiante.



## Capítulo 1 B

Metformina en condiciones fisiológicas:

Animales expuestos *in utero* y  
durante la lactancia

## **METODOLOGÍA**

### **MODELO EXPERIMENTAL**

Como ya fue descripto en el Capítulo 1 A, las hembras C57BL/6 control o tratadas con metformina por 4 semanas, fueron apareadas con machos de fertilidad comprobada, sosteniendo el tratamiento durante toda la preñez y lactancia. Finalizada la misma, las crías fueron sexadas, pesadas y separadas de sus madres. Se conservó solo a las hembras, obteniendo dos grupos experimentales: **grupo F1 Control** y **grupo F1 Met**. Durante las 7 semanas siguientes, se permitió que las crías de ambos grupos crecieran con disponibilidad *ad libitum* de alimento y bebida, sin ningún tratamiento adicional realizado. Se registró el peso semanalmente y durante los últimos 14 días del experimento, se cicló de forma diaria a algunos animales de ambos grupos para estudiar posibles alteraciones del ciclo estral. A las 10 semanas de vida, se realizó también una curva de tolerancia a la glucosa y luego se separó a las hembras en dos subgrupos.

En el primero, se anestesió a los animales y se realizó una punción cardíaca para obtener sangre. Una vez coagulada y centrifugada la misma, se obtuvo suero que fue conservado a -80° para su posterior utilización. Se extrajo y pesó el tejido adiposo mesentérico y gonadal, el hígado y los ovarios, los cuales fueron limpiados del tejido adherente subyacente y congelados o fijados en solución de Bouin para realizar posteriormente técnicas de western blot y de inmunohistoquímica.

En el segundo subgrupo los animales de ambos grupos fueron puestos en apareo con machos de fertilidad comprobada. Se estudió el tiempo que demoraron hasta lograr la preñez, tomando como día 1 aquel en el cual se visualizó el tapón vaginal, resultado de la cópula. La cantidad de crías obtenidas en la F2 y el peso de las mismas al nacer fue analizado.

La figura 17 muestra un diagrama esquemático del diseño experimental.

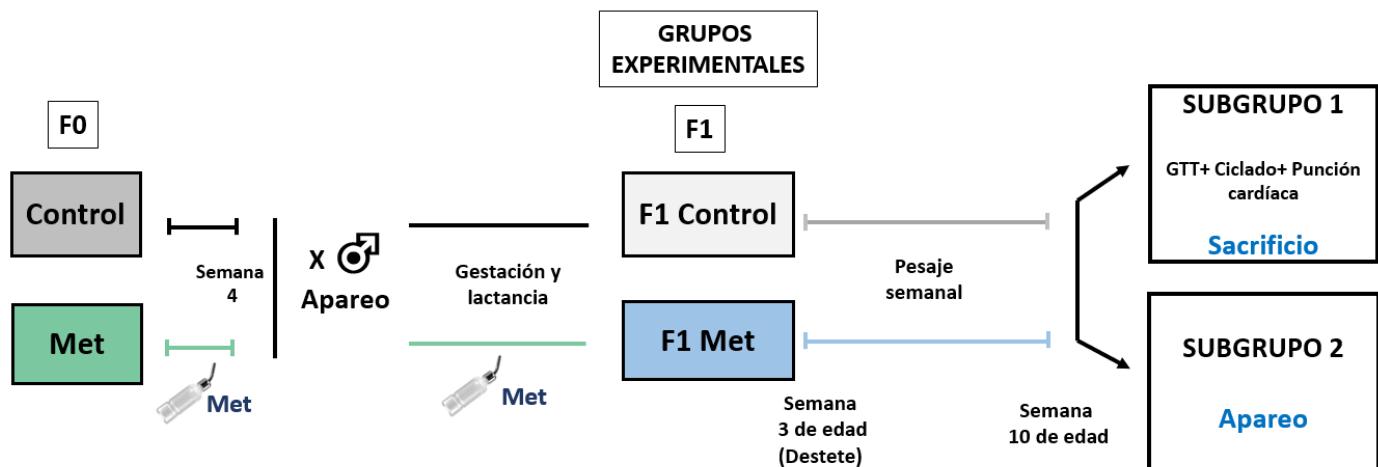


Figura 17: Diagrama esquemático del diseño experimental. Met: metformina. GTT: Curva de tolerancia a la glucosa.

## TÉCNICAS

Las técnicas de ciclado, GTT, medición hormonal, inmunohistoquímica, western blot, recuento folicular y apareo fueron realizadas según lo descripto en el Capítulo 1 A, al igual que el análisis estadístico.

## **RESULTADOS**

### **Efectos en parámetros metabólicos**

Con el objetivo de analizar posibles alteraciones metabólicas en las crías de ratones hembra tratadas con metformina en comparación con las no tratadas, pesamos a los animales al momento de nacer ( $n=40-80$ ), al finalizar la lactancia y luego una vez por semana durante siete semanas, alcanzando la adultez ( $n=12-24$ ).

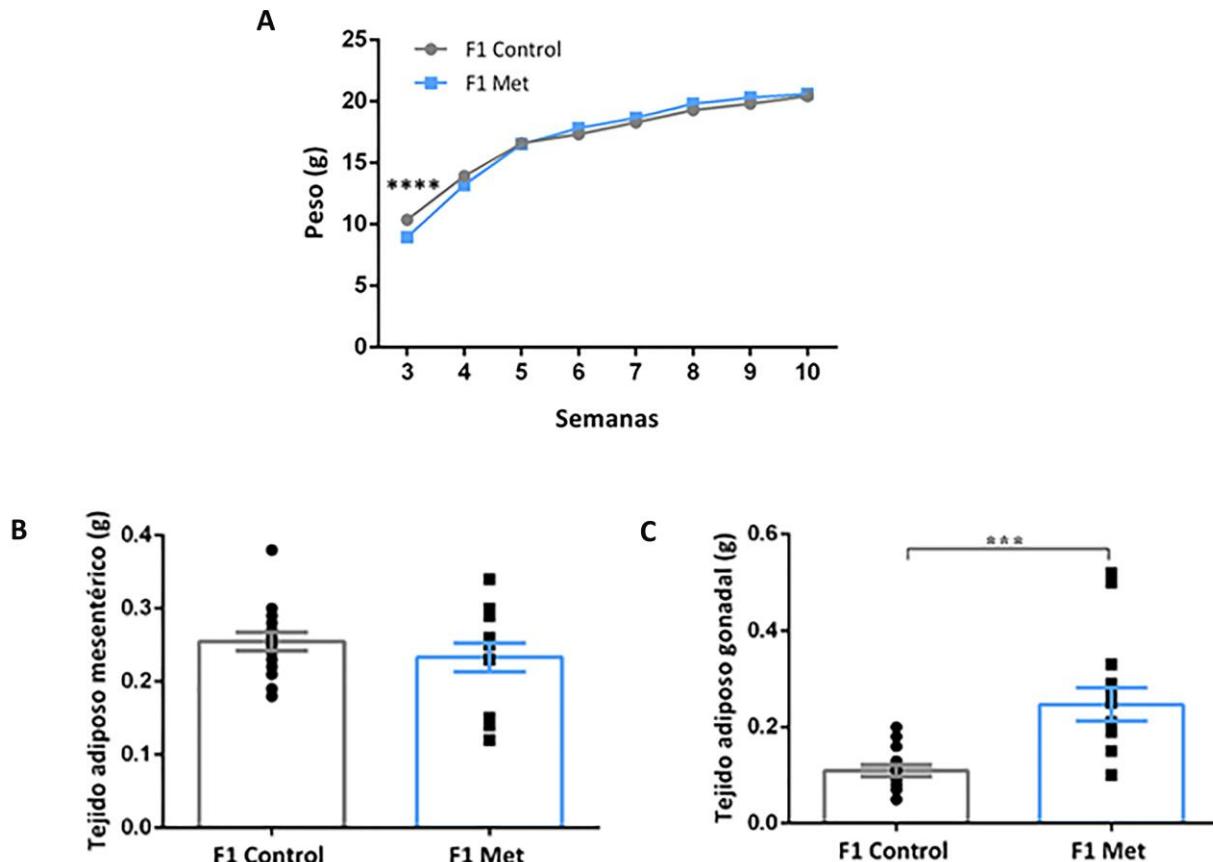
Como ya fue descripto en el Capítulo 1 A, las crías de los animales tratados con la droga mostraron menor peso corporal al momento del nacimiento (Figura 16 C) ( $p <0,001$ ). Finalizada la lactancia, no se logró una recuperación del mismo ( $p <0,001$ ), sin embargo, una vez transcurrida la primera semana de alimentación independiente de los animales, el peso corporal se restableció, no mostrando diferencias con el peso de las crías de los animales control (Figura 18 A) ( $p >0,05$ ).

Por otro lado, no encontramos diferencias significativas en los valores de glucemia basal ( $n=5$ ) ni en la curva de tolerancia a la glucosa entre grupos (Tabla 3) ( $n=6$ ;  $p >0,05$ ), como así tampoco en el peso del hígado (F1 Control:  $0,96 \pm 0,02$  g; F1 Met:  $0,87 \pm 0,04$  g), ni en el tejido adiposo mesentérico (Figura 18 B) ( $n=13-15$ ;  $p >0,05$ ). Contrariamente, el tejido adiposo gonadal se mostró significativamente aumentado en el grupo F1 Met (Figura 18C) ( $n=14$ ;  $p <0,001$ ).

**Tabla 3:** Parámetros metabólicos y hormonales de ratones F1 Control y F1 Met a la semana 10 de edad.

	F1 Control	F1 Met
Glucemia (mg/dL)	141.40 ± 12.57	139.20 ± 6.43
ABC (min*mg/dL)	22887 ± 1271	20432 ± 1173
Estradiol (pg/mL)	13.48 ± 2.86	9.14 ± 1.54
Progesterona (ng/mL)	5.09 ± 0.41	4.82 ± 0.60
LH (ng/mL)	8.89 ± 0.86	8.24 ± 1.13
FSH (ng/mL)	112.7 ± 12.57	137.7 ± 25.85

Los datos están expresados como la media ± SEM. T-test se utilizó para realizar comparaciones entre grupos. ABC: Área bajo la curva de glucosa. Diferencias significativas fueron definidas como p<0,05.

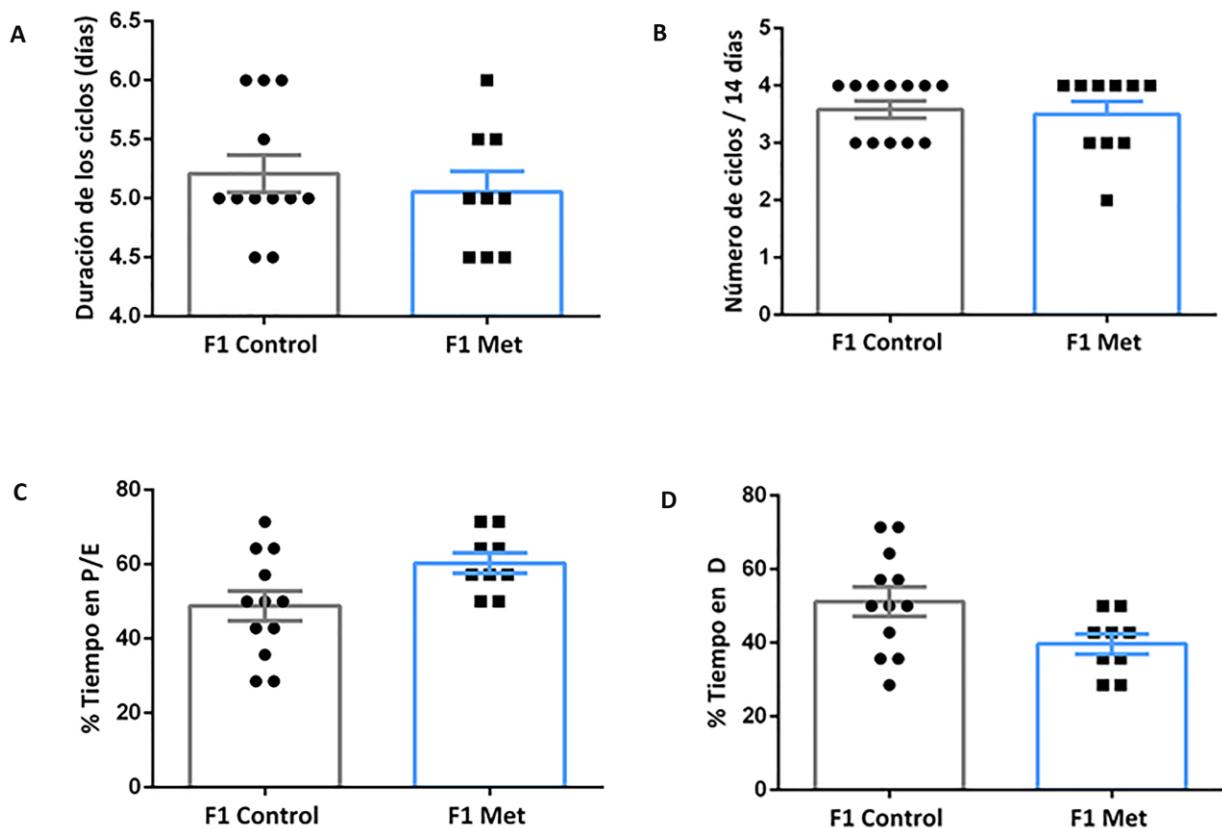


**Figura 18. Peso corporal y tejido adiposo en los grupos F1 Control y F1 Met.** (A) Ganancia de peso corporal durante las siete semanas del experimento (B) Peso del tejido adiposo mesentérico. (C) Peso del tejido adiposo gonadal. Los datos se expresan como la media ± el error estándar de la media (SEM). \*\*\*p <0,001.

### **Efectos en el ciclo estral y en la producción hormonal**

Dado que los animales tratados con metformina mostraron alteraciones en el ciclo estral, estudiamos este parámetro en las crías. A diferencia de las madres, no se observaron cambios en la cantidad de ciclos totales, en la duración de los mismos ni en el tiempo que pasaban los animales en cada una de las fases del ciclo estral, comparado a las crías de las hembras control (Figura 19) (n=10-12; p >0,05).

Tampoco se observaron diferencias en las concentraciones séricas de estradiol, progesterona, FSH o LH (n=5-7; p >0,05), (Tabla 3), indicando que el eje reproductivo no se encontraba alterado.

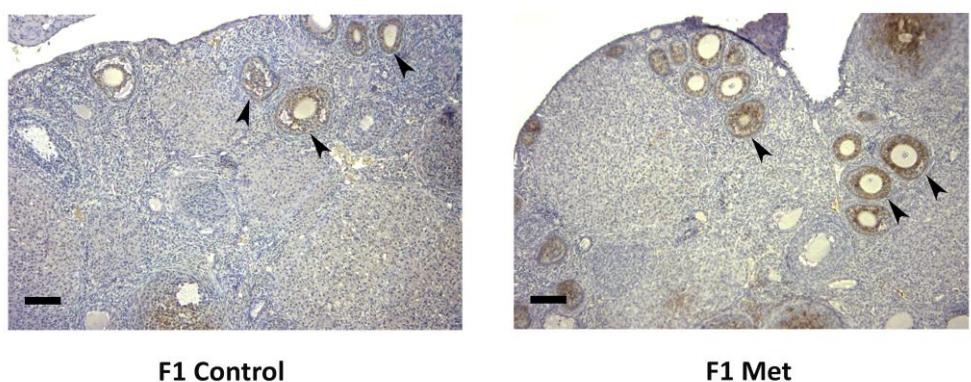
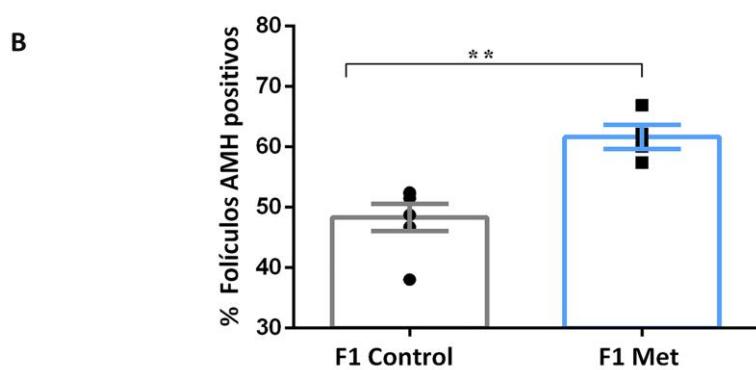
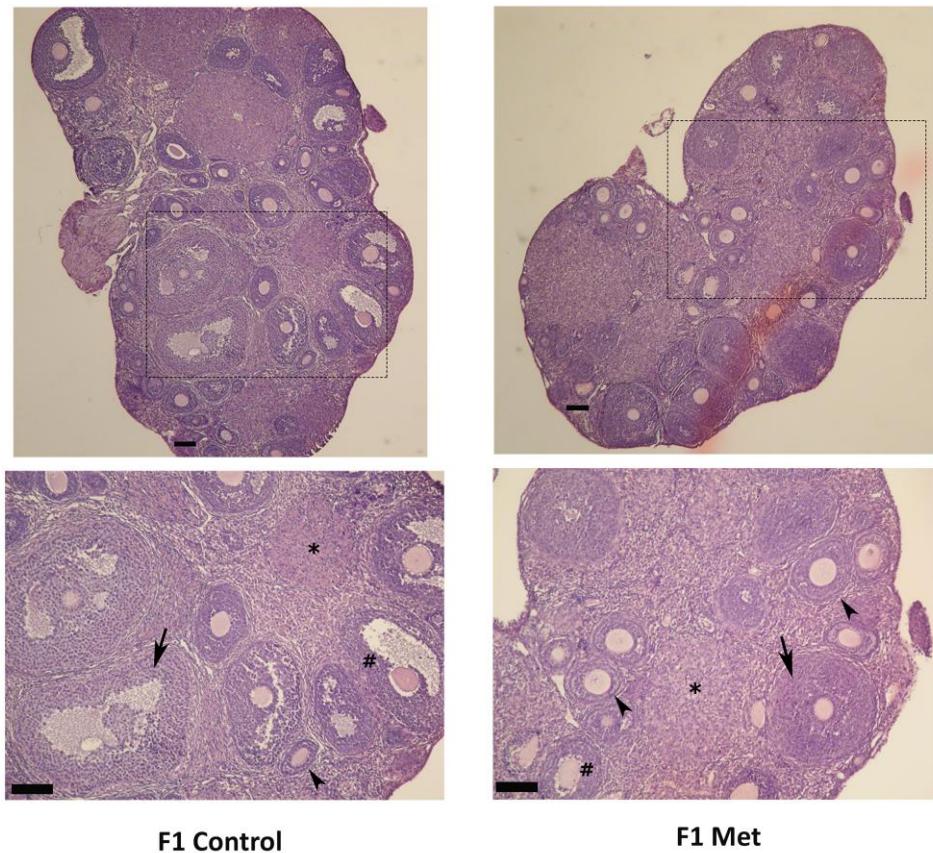
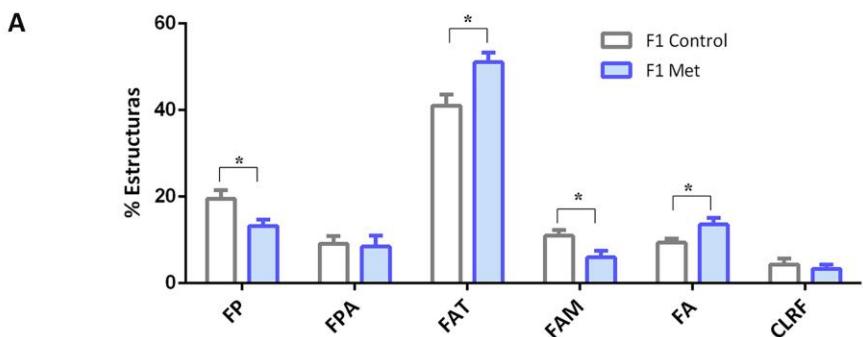


**Figura 19. Ciclo estral de las crías de madres tratadas con metformina.** (A) Duración de los ciclos. (B) Número de ciclos en 14 días. (C) % de tiempo transcurrido en las fases Proestro y Estro. (D) % de tiempo transcurrido en las fases Diestro I y Diestro II. Los datos se expresan como la media ± el error estándar de la media (SEM).

#### **Efectos en el desarrollo folicular y en la expresión de la hormona antimülleriana**

La dinámica folicular puede verse afectada por múltiples factores, por lo que se realizó un recuento folicular en cortes de ovario de las crías de ambos grupos experimentales. El desarrollo folicular se encontró alterado en el grupo F1 Met, observando un menor porcentaje de folículos primarios y antrales maduros, y un mayor porcentaje de folículos antrales tempranos y atrésicos comparado con el grupo F1 Control ( $n=6-7$ ;  $p <0,05$ ). El porcentaje de folículos preantrales y de cuerpos lúteos no mostró diferencias entre los grupos ( $n=6-7$ ;  $p >0,05$ ) (Figura 20 A).

A continuación, se estudió el porcentaje de folículos productores de AMH con respecto a la cantidad de folículos totales, pudiendo observar un porcentaje mayor de folículos AMH positivos en el grupo F1 Met, comparado con el grupo F1 control ( $n=5-6$ ;  $p <0,01$ ) (Figura 20 B)

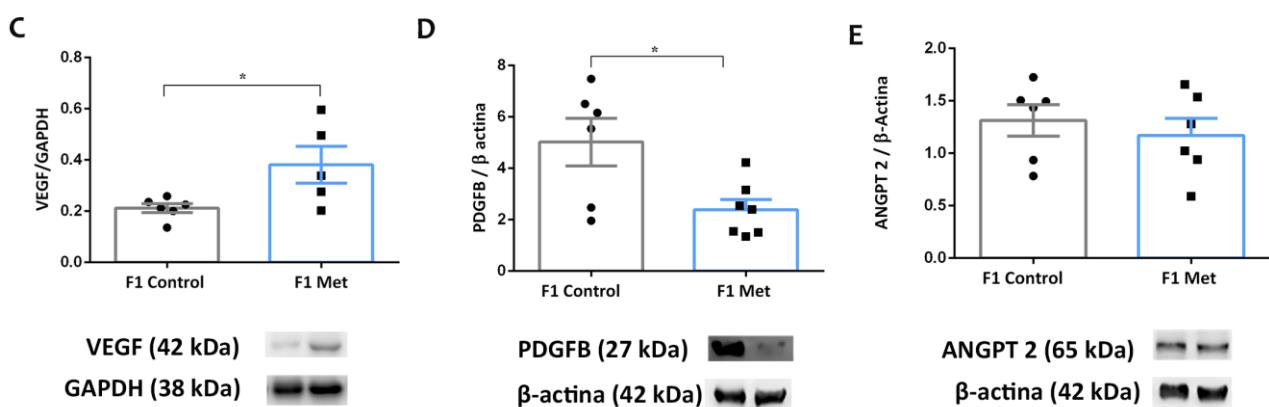
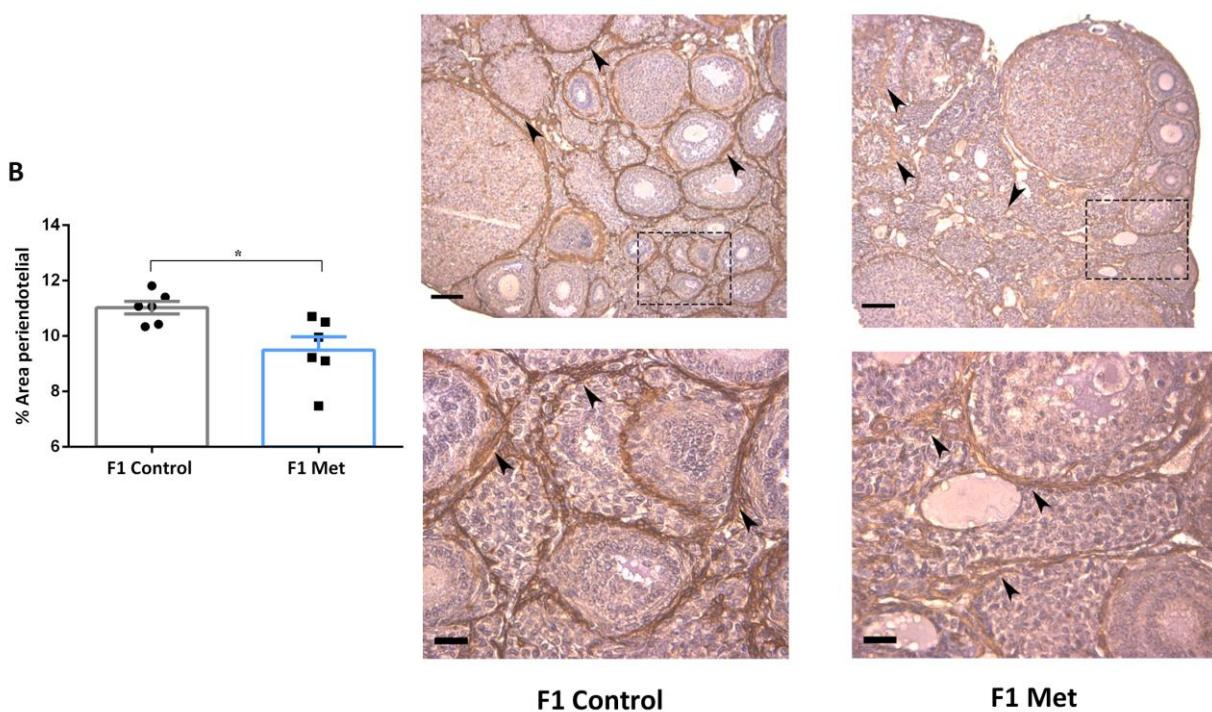
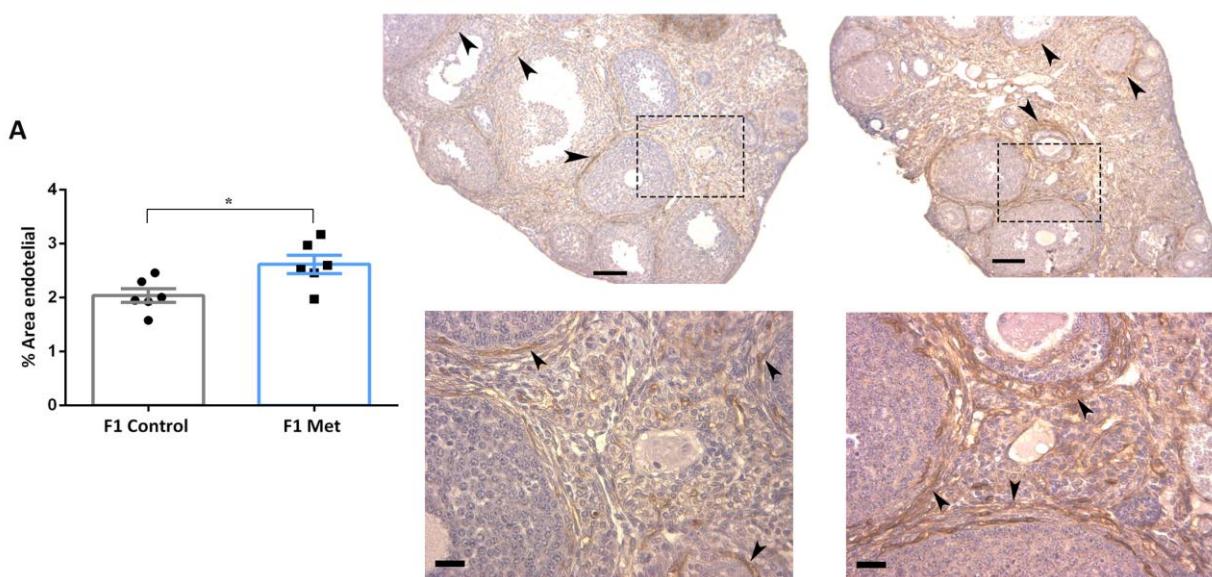


**Figura 20. Recuento folicular e inmunomarcación de hormona antimülleriana.** (A) Porcentaje de cada estructura en secciones ováricas teñidas con H&E. FP: folículo primario. FPA: folículo preantral. FAT: folículo antral temprano. FAM: folículo antral maduro. FA: folículo atrésico. CLRF: Cuerpo lúteo recientemente formado. Las fotografías muestran imágenes representativas de los ovarios. Paneles superiores: barra de escala de 100 µm, aumento de 40X. Paneles inferiores: barra de escala de 100 µm, aumento de 100X; n=6-7. Las puntas de flecha indican folículos antrales tempranos; las flechas indican folículos antrales tardíos; los signos numerales indican folículos atrésicos; los asteriscos indican cuerpo lúteo. (B) Folículos AMH positivos, marcados por inmunohistoquímica. Las cabezas de flecha muestran tinción positiva con AMH. Escala: 100 µm; magnificación 100X. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01.

### **Efecto en la vasculatura ovárica**

Con el fin de analizar el estado de la vasculatura del ovario, estudiamos mediante inmunohistoquímica a CD34 y  $\alpha$ -SMA, marcadores de células endoteliales y periendocteliales vasculares (pericitos y células musculares lisas), respectivamente. Como resultado observamos que los animales del grupo F1 Met, tenían una mayor expresión de CD34 en comparación con el grupo F1 Control (Figura 21 A) (n=6; p <0,05), y una menor expresión de células  $\alpha$ -SMA positivas (Figura 21 B) (n=6; p <0,05).

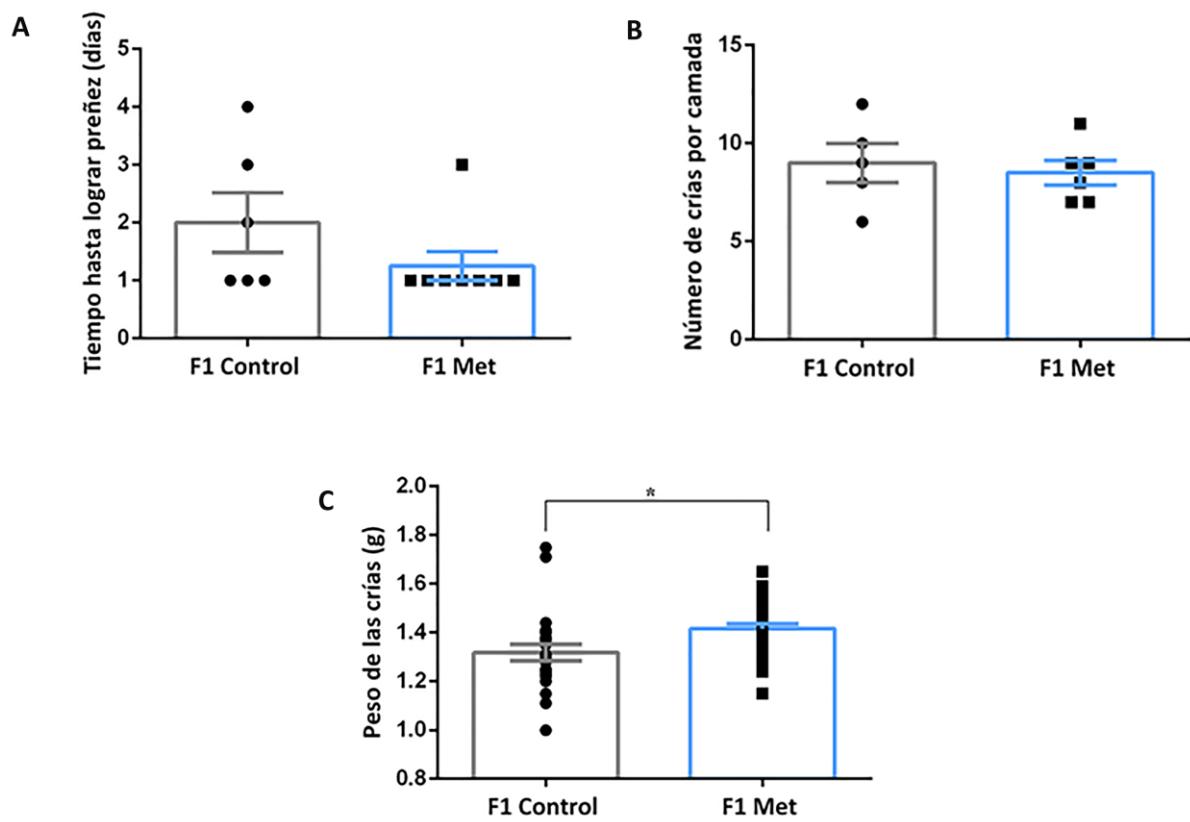
Además, pudimos observar un aumento significativo del factor angiogénico VEGF (Figura 21 C) (n=5-7; p <0,001) y una disminución significativa del factor PDGFB en el grupo F1 Met (Figura 21 D) (n=6-7; p <0,05), sin cambios en el factor Angiopoyetina 2 (Figura 21 E) (n=6; p >0,05).



**Figura 21. Angiogénesis ovárica.** (A) Inmunotinción de células endoteliales con anticuerpo anti-CD34. (B) Inmunotinción de células periendoeliales con anticuerpo SMC- $\alpha$ -actina. Para la inmunohistoquímica se analizaron cuatro secciones por ovario, seis ovarios por grupo. Las fotografías muestran secciones histológicas representativas de los ovarios. Paneles superiores: barra de escala de 100  $\mu\text{m}$ , aumento de 100X. Paneles inferiores: barra de escala de 25  $\mu\text{m}$ , aumento de 400X. Las puntas de flecha indican inmunotinción positiva. (C) VEGF. (D) PDGFB. (E) ANGPT2. Para los western blots, la densidad de cada banda se normalizó a las bandas de GAPDH o  $\beta$  actina. Los paneles inferiores muestran las bandas representativas de cada proteína analizada. Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). \* $p < 0,05$ .

### **Efectos en parámetros de fertilidad**

Para evaluar el rendimiento reproductivo de los ratones, apareamos a las hembras con machos C57BL/6 de fertilidad comprobada. No se encontraron diferencias significativas en el tiempo que tardaron los animales para lograr la preñez, ni en la cantidad de crías obtenidas por camada ( $n=5-8$ ;  $p > 0,05$ ), pero sí en el peso de las mismas al nacer, que fue significativamente mayor en las crías del grupo F1 Met, comparado con las crías del grupo F1 Control (Figura 22 A-C) ( $n=28-35$ ;  $p < 0,05$ ).



**Figura 22. Efectos en la fertilidad natural.** (A) Tiempo hasta lograr preñez. (B) Número de crías por camada. (C) Peso de las crías. Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM).

\* $p < 0,05$ .

## **DISCUSIÓN**

A pesar de que el uso de metformina como agente hipoglucemiante está ampliamente adoptado en la práctica clínica debido a su efectividad, facilidad de administración y mínimos efectos secundarios, es un fármaco capaz de atravesar la placenta, lo que podría afectar potencialmente el desarrollo fetal [98,135]. Por esta razón, su uso durante el embarazo en condiciones como la DMG o SOP sigue siendo controvertido [88,136]. Se han realizado pocos estudios a corto, mediano y largo plazo para observar los efectos en la descendencia, centrándose generalmente en el análisis de posibles consecuencias teratogénicas y metabólicas en los hijos de madres tratadas con metformina durante el embarazo [137]. Debido a las discrepancias encontradas, es extremadamente necesario realizar análisis a largo plazo para esclarecer los posibles efectos adversos en la descendencia de madres tratadas con metformina durante el embarazo [138]. En este capítulo nos enfocamos en los efectos reproductivos y metabólicos a largo plazo en las crías hembra adultas que fueron expuestas a metformina *in utero* y durante la lactancia. Encontramos que las crías de animales tratados presentaron alteraciones en el peso corporal, tanto al nacer como al destete, así como en el tejido adiposo gonadal en la edad adulta. La dinámica folicular y la angiogénesis ovárica se vieron alteradas por la exposición a metformina, aunque no se observaron efectos en la fertilidad de los animales. No obstante, el peso al nacer de la generación F2 de animales expuestos a metformina fue mayor que en los animales no expuestos a la droga.

Estudios previos han informado que el tratamiento con metformina en pacientes conduce a una reducción en el peso corporal [139], efecto que también reportaremos en el capítulo 2 de esta tesis, utilizando un modelo animal alimentado con una dieta alta en grasas, donde la administración del fármaco detuvo el aumento de peso causado por el consumo de la dieta [140]. En cuanto al peso al nacer en humanos, se observaron diferencias según la condición por

la cual la madre recibió metformina. Mientras que no se observaron diferencias significativas en el peso al nacer de los recién nacidos de madres obesas [141,142] o madres con SOP [134,143] tratadas con metformina, los recién nacidos de madres tratadas por DMG o DT2 tenían un peso al nacer más bajo en comparación con los recién nacidos de madres no tratadas con metformina [101,102]. Como ya discutimos en el capítulo 1 A, en nuestro modelo de ratones sin patologías subyacentes, el peso al nacer de las crías expuestas a metformina fue más bajo, lo que sugiere que metformina ejerce un efecto sobre el crecimiento intrauterino que es independiente de la condición previa de la madre. Este efecto probablemente se deba a la estimulación de AMPK y del catabolismo celular por parte de metformina durante el desarrollo, así como a los cambios epigenéticos en genes relacionados con la adipogénesis, como se describió anteriormente [144].

Por otro lado, en la edad adulta, los animales expuestos a metformina exhibieron mayor tejido adiposo gonadal que aquellos no expuestos a metformina, a pesar de que esto no se reflejó en su peso corporal. No existen estudios en humanos que evalúen el peso corporal o la distribución del tejido adiposo en la descendencia adulta de madres que fueron tratadas con metformina durante el embarazo. Sin embargo, existen algunos estudios de seguimiento en niños expuestos a metformina *in utero*. Los resultados también varían según la condición de la madre. Mientras que no se observaron diferencias en el índice de masa corporal (IMC) en niños de 5 y 2 años nacidos de mujeres obesas [145,146] y mujeres con DT2 [147] tratadas con metformina, los niños de madres con SOP o DMG tratadas con metformina tenían un IMC más alto que aquellos no expuestos al fármaco [103,104,148,149]. Un estudio de seguimiento de los hijos de 2 años de madres con DMG tratadas con metformina o insulina encontró que, aunque la masa grasa total era similar en ambos grupos, la grasa subcutánea en los niños tratados con metformina era mayor, concluyendo que metformina podría causar una redistribución de los depósitos de

grasa en estos niños [104]. Nuestros resultados en ratones adultos también sugieren que, a pesar de que no se observan diferencias en el peso corporal, existe una redistribución del tejido adiposo, ya que encontramos mayor grasa gonadal en comparación con ratones no expuestos a metformina. Es posible que la droga, actuando sobre las células del embrión, pueda inducir una reprogramación metabólica del desarrollo que conduce a una redistribución del tejido adiposo en la adultez. Estos resultados son interesantes y refuerzan la necesidad de evaluar el patrón de distribución de grasa en humanos adultos que fueron expuestos a metformina *in utero*, ya que podría tener implicancias importantes para la sensibilidad a la insulina. En línea con los estudios sobre efectos metabólicos a largo plazo en humanos [150,151] y animales [152], en nuestro estudio no observamos diferencias en el metabolismo ni en los niveles basales de glucosa en ratones adultos expuestos a metformina *in utero*.

Además de las alteraciones metabólicas, las alteraciones endocrinas pueden tener importantes consecuencias para la salud reproductiva de los animales. Por lo tanto, estudiamos el eje reproductivo de las crías analizando las concentraciones séricas de estradiol, progesterona, LH y FSH. Estudios previos han reportado cambios en las concentraciones ováricas de receptores de LH y FSH en la descendencia de ratas con SOP tratadas con metformina [153] y un aumento en el estradiol sérico en la descendencia adulta de ratas expuestas al fármaco durante la gestación y lactancia [154]. En nuestro modelo, los ratones expuestos a metformina no mostraron cambios en ninguna de las hormonas analizadas en comparación con los animales no expuestos al fármaco. Las diferencias con hallazgos previos pueden deberse a la especie utilizada, la patología de la madre, la edad de los animales o el momento del ciclo en el que se analizó el perfil hormonal. Por esta razón, es necesario analizar posibles alteraciones hormonales y cambios en el ciclo menstrual en mujeres adultas que fueron expuestas a metformina durante su desarrollo y lactancia.

Posteriormente, estudiamos el ciclo estral de la descendencia en su adultez. En estudios previos con animales, no se observaron alteraciones en los parámetros analizados, como la edad en la que ocurrió el primer estro, su duración o el tiempo pasado en cada una de las fases en animales expuestos a metformina *in utero* [154,155]. Esto permitió que los animales ciclaran normalmente y se aparearan regularmente [154], en contraste con la descendencia masculina de madres tratadas con metformina, quienes mostraron alteraciones en el comportamiento sexual [156]. En consonancia con estos estudios, en nuestro modelo, el ciclo estral no mostró alteraciones en comparación con los animales no expuestos al fármaco.

Más allá del comportamiento sexual de los animales y su estado endocrino, la fertilidad depende del adecuado desarrollo folicular y la ovulación de un ovocito de buena calidad. Para que esto ocurra, es necesaria una vasculatura ovárica estable, que no debe estar ni exacerbada ni deficiente, permitiendo la entrega de nutrientes, hormonas, oxígeno y factores de crecimiento a los folículos en desarrollo. Metformina tiene la capacidad de regular la angiogénesis en varios sistemas. La mayoría de los estudios reportan un efecto inhibidor en el desarrollo vascular, donde la angiogénesis disminuye principalmente al reducirse la expresión del principal factor proangiogénico, VEGF [71,83,140,157,158]. Con el objetivo de analizar la vasculatura ovárica en la descendencia de animales tratados con el fármaco, estudiamos el área vascular, observando un aumento en el área endotelial y una disminución en el área periendoletal. Dado que la formación de vasos sanguíneos depende de la acción coordinada y de niveles adecuados de factores angiogénicos, medimos posteriormente la expresión de los factores angiogénicos más importantes, encontrando un aumento en las concentraciones de VEGF y una disminución en los niveles de PDGFB. Estos resultados podrían explicar el mayor desarrollo de vasos sanguíneos en el ovario, los cuales son inestables, inmaduros y poco funcionales debido a la insuficiente cobertura periendoletal. En estudios previos que

realizamos en ratas con SOP, así como en células de granulosa de rata en cultivo, encontramos que metformina disminuye VEGF y aumenta PDGFB en el ovario [67,83]. Sin embargo, en este trabajo, encontramos que los ratones expuestos a metformina durante el desarrollo y la lactancia presentan niveles aumentados de VEGF y niveles reducidos de PDGFB, lo que sugiere un efecto de programación fetal diferente al efecto directo de la metformina en el ovario. Hasta donde sabemos, no existen estudios hasta la fecha que evalúen la vasculatura ovárica en mujeres que fueron expuestas a metformina durante su desarrollo. Basándonos en nuestros resultados en ratones, sería importante evaluar este parámetro en estas mujeres, ya que su alteración podría estar relacionada con problemas de fertilidad. Además, sería crucial investigar la vasculatura en otros órganos de mujeres y hombres expuestos a metformina durante el desarrollo. Dado que la angiogénesis es poco común en adultos bajo condiciones fisiológicas, es posible que, en respuesta a una lesión o a una patología que requiera la formación de nuevos vasos sanguíneos, este proceso no ocurra adecuadamente en estos individuos.

En nuestro laboratorio, también demostramos que el tratamiento con metformina mejora la dinámica folicular en un modelo de ratas con SOP [83]. En este trabajo, observamos que la dinámica folicular estaba alterada en la descendencia, con un menor porcentaje de folículos antrales primarios y maduros, y un mayor porcentaje de folículos antrales tempranos y atrésicos. Solo un estudio ha evaluado el efecto de la exposición a metformina durante el desarrollo y la lactancia en ratas hembras adultas, y no encontró diferencias significativas en los diferentes estadios foliculares [154]. Sin embargo, en ese trabajo, los autores clasificaron los estadios foliculares de manera diferente, lo que puede haber enmascarado las alteraciones que sí observamos en nuestro estudio. Por otro lado, se trató de un modelo diferente al haber sido realizado en otra especie. En las primeras etapas del desarrollo folicular, los folículos no tienen receptores de gonadotropinas, por lo que su crecimiento es independiente de estas hormonas

y está influenciado por la señalización de varias moléculas. Entre ellas, el PDGFB es capaz de promover la transición de folículos primordiales a folículos primarios [62], mientras que la AMH, por el contrario, es capaz de inhibirla [159]. En este modelo, observamos una disminución en las concentraciones ováricas de PDGFB, lo que podría explicar parcialmente la disminución en el porcentaje de folículos primarios, y un aumento en las concentraciones de AMH, coincidiendo con el mayor número de folículos antrales tempranos, que son los principales secretores de esta hormona. La alteración en estos factores puede ser una de las posibles razones por las que se encontraron diferencias en las primeras etapas del desarrollo folicular en animales expuestos a metformina. Por otro lado, encontramos un aumento en el porcentaje de folículos antrales tempranos que no se reflejó en un aumento en el número de folículos antrales maduros o cuerpos lúteos, sino en el número de folículos atrésicos presentes en el ovario. Esto sugiere que, aunque la transición de los folículos de la etapa primaria a la antral temprana está exacerbada, no todos estos continúan su desarrollo; más bien, una parte significativa de los folículos sufre atresia. Las alteraciones observadas en la microvasculatura ovárica de los animales expuestos a metformina, pueden explicar parcialmente la mayor proporción de folículos atrésicos y la menor proporción de folículos antrales maduros, sin embargo, se necesitan más estudios para dilucidar qué otros factores que influyen en la maduración folicular están afectados en la descendencia de madres tratadas con metformina.

Finalmente, nuestro objetivo fue analizar si las alteraciones ováricas encontradas en las hembras expuestas a metformina tuvieron algún efecto en la fertilidad de estos animales. Los animales expuestos a metformina *in utero* y durante la lactancia tardaron el mismo tiempo que los animales control en lograr la preñez, y el número de crías que tuvieron fue similar al de los animales no expuestos al fármaco. Estos resultados son consistentes con estudios previos realizados en la descendencia adulta de ratas expuestas a metformina durante el desarrollo y

la lactancia, las que no mostraron diferencias en los parámetros de fertilidad en comparación con las ratas no expuestas [154]. Sin embargo, la descendencia de los animales expuestos a metformina *in utero*, es decir, la generación F2, tuvo un mayor peso al nacer, lo que demuestra consecuencias metabólicas incluso en una segunda generación de animales tratados. Es importante tener en cuenta que los ovocitos que dieron lugar a la progenie maduraron en un ambiente ovárico alterado como resultado del tratamiento con metformina administrado a las madres antes del embarazo. En el capítulo 1 A de esta tesis, demostramos que los ovarios de las hembras tratadas con metformina presentaban una angiogénesis reducida y un desarrollo folicular temprano deteriorado. Además, los niveles de estradiol estaban elevados, mientras que los niveles de progesterona estaban disminuidos. Estas alteraciones en el ambiente ovárico podrían influir en los ovocitos en desarrollo, potencialmente induciendo cambios epigenéticos que podrían afectar a la progenie en la adultez. Metformina también podría afectar a las mitocondrias de los ovocitos, y las organelas disfuncionales podrían transferirse a las células ováricas de la descendencia que no estuvo expuesta directamente a metformina [160]. Además, en nuestro modelo, los embriones estuvieron expuestos a metformina *in utero* durante todo el embarazo. Por lo tanto, estos dos mecanismos —las alteraciones en la maduración de los ovocitos y los cambios inducidos durante el desarrollo embrionario— podrían contribuir de forma independiente o sinérgica a los fenotipos observados en la progenie adulta, incluidas las alteraciones en la angiogénesis ovárica, el desarrollo folicular y la redistribución del tejido adiposo. Se requieren más estudios para esclarecer la influencia específica de cada mecanismo en la fisiología ovárica y el metabolismo de la descendencia en la adultez.

En resumen, se observaron algunas alteraciones metabólicas y ováricas en la descendencia de ratones hembra tratadas con metformina antes y durante la gestación, así como durante la

lactancia. Se observaron cambios en la angiogénesis y el desarrollo folicular en este órgano. No se observaron alteraciones en las gonadotrofinas, en los niveles séricos de estradiol y progesterona, ni en el ciclo estral. La fertilidad natural de los animales no se modificó, pero se observaron cambios en el peso corporal de la segunda generación de ratones tratados.

Concluimos que metformina puede inducir programación fetal en animales expuestos durante el desarrollo, afectando tanto el metabolismo como la funcionalidad ovárica en la edad adulta. Sin embargo, en condiciones fisiológicas, estas alteraciones no resultan en una reducción de la fertilidad ni en una disrupción endocrina. Se requiere más investigación para esclarecer si los cambios ováricos observados exacerbaban el descenso de la fertilidad cuando coexisten con factores ambientales adversos o patologías reproductivas que afecten a mujeres u hombres. Nuestros datos justifican la realización de estudios en mujeres para trasladar estos hallazgos a la población humana y tomar decisiones informadas sobre la administración de metformina durante períodos críticos del desarrollo en entornos clínicos. Basándonos en nuestros hallazgos, consideramos que la decisión de administrar metformina en mujeres embarazadas debe implicar siempre una evaluación de la relación riesgo-beneficio. Las alteraciones observadas en este estudio, a menos que estudios en mujeres indiquen lo contrario, no son lo suficientemente significativas como para contraindicar la administración de metformina durante el embarazo en pacientes que puedan beneficiarse de este fármaco.



# **CAPÍTULO 2:**

## **METFORMINA EN**

## **CONDICIONES PATOLÓGICAS**

## **INTRODUCCIÓN**

El término “metabolismo” refiere al conjunto de reacciones químicas y procesos biológicos que ocurren en todas las células de los seres vivos para convertir los nutrientes en energía y materiales esenciales para el crecimiento, mantenimiento y funcionamiento del organismo. Estas reacciones incluyen tanto procesos de síntesis de nuevas moléculas (anabolismo) como de degradación de sustancias para obtener energía (catabolismo). El metabolismo permite a los organismos mantener sus funciones vitales, como la respiración, la digestión, la reproducción y la reparación celular. El desequilibrio entre las reacciones catabólicas y las reacciones anabólicas puede provocar el desarrollo de enfermedades como la obesidad o la desnutrición.

Diversos órganos y sistemas están involucrados en el mantenimiento del metabolismo. Entre ellos se encuentran el páncreas, órgano metabólico clave que regula la cantidad de carbohidratos en sangre, ya sea liberando cantidades significativas de insulina para reducir los niveles de glucosa circulante o liberando glucagón para aumentarlos; el hígado, que procesa los aminoácidos y lípidos absorbidos por el intestino delgado, además de regular el ciclo de la urea y procesos metabólicos esenciales como la gluconeogénesis y el depósito de glucógeno; y el tejido adiposo, cuya principal función es almacenar energía en forma de grasa. Cuando el ingreso de nutrientes a través de la ingesta es mayor que el gasto energético, el tejido adiposo sufre dos fenómenos conocidos como hipertrofia e hiperplasia [161]. Las células que lo conforman, denominadas adipocitos, aumentan de tamaño durante la hipertrofia, al depositarse en ellos una mayor cantidad de lípidos, específicamente triglicéridos. Este es el mecanismo inicial y más común en las primeras etapas del aumento de peso; sin embargo, cuando el tejido adiposo ya no puede manejar el exceso de energía solo mediante la hipertrofia, recluta células madre o pre-adipocitos capaces de diferenciarse en nuevos adipocitos. De esta forma, el número de células con capacidad de almacenar el exceso energético en forma de grasa

aumenta.

La hipertrofia e hiperplasia del tejido adiposo tiene importantes consecuencias. Las células adiposas agrandadas pueden liberar citoquinas pro-inflamatorias, que generan un estado de inflamación sistémica crónica de bajo grado [162,163] y que además interfieren en distintos procesos fisiológicos, como la acción de la insulina, lo cual provoca una disminución en la capacidad del cuerpo para regular los niveles de glucosa en sangre. A su vez, los adipocitos muy agrandados pueden volverse menos eficientes en la gestión de la grasa y en la liberación de hormonas reguladoras como la leptina, que controla el apetito y el equilibrio energético; o la adiponectina que mejora la sensibilidad a la insulina y tiene efectos antiinflamatorios [164].

Por otro lado, al subir de peso, además de aumentar la inflamación, aumenta la hipoxia en el tejido adiposo, dado que los vasos sanguíneos existentes no logran cubrir el requerimiento de oxígeno, al haber una mayor cantidad de células de gran tamaño [165]. Este fenómeno, conduce a la secreción de factores pro-angiogénicos que estimulan la formación de nuevos vasos, para satisfacer así los requisitos de oxígeno. Dado que la angiogénesis es necesaria para el aumento del tejido adiposo, algunos compuestos anti-angiogénicos han sido propuestos para tratar la obesidad. Por el contrario, la pérdida de peso se acompaña de la regresión de los vasos sanguíneos, lo que muestra la plasticidad de este tejido [166].

Las patologías metabólicas presentes en la población son variadas y de etiología diversa, pudiendo ser hereditarias o adquiridas. Entre las más frecuentes se encuentran la diabetes mellitus, tanto de tipo 1 como de tipo 2, la obesidad, la resistencia a la insulina, dislipidemias, el síndrome metabólico y la DMG. Las enfermedades metabólicas hereditarias suelen diagnosticarse en la infancia, mientras que las adquiridas, como la DT2 o el síndrome metabólico, pueden desarrollarse más adelante en la vida.

Si bien inicialmente estas patologías se encontraban asociadas a la edad avanzada, los cambios en el estilo de vida han adelantado su aparición, aumentando su prevalencia a nivel mundial. Países industrializados donde las dietas son más calóricas y el estilo de vida es sedentario, muestran una mayor incidencia de enfermedades como la obesidad, la DT2 y el síndrome metabólico, las cuales afectan entre un 10 y un 25% de la población mundial [167–169]. A su vez, la presencia de estas patologías aumenta el riesgo en los pacientes de sufrir enfermedades cardiovasculares y de presentar diferentes co-morbilidades asociadas, así como también aumenta en grado variable el riesgo de padecer diversos tipos de cánceres [170]. Más aún, recientemente se ha descripto que ciertas alteraciones metabólicas pueden ser transmitidas a las generaciones siguientes por mecanismos de herencia no cromosómica materna y paterna [171–175].

Por su parte, el eje reproductivo femenino es altamente dependiente del balance energético, es decir, es necesario que la relación entre la ingesta y el gasto energético sea óptima para que el eje no se encuentre alterado [176]. Es por esto que se ha visto un retraso en la pubertad en jóvenes extremadamente delgadas mientras que en jóvenes obesas es muy común la pubertad precoz [177,178]. En mujeres en edad reproductiva que presentan patologías como el síndrome metabólico, se han visto asociados problemas de subfertilidad, aumento de las tasas de pérdida precoz del embarazo y preeclampsia [179].

En mujeres obesas, se ha observado una mayor incidencia de irregularidades menstruales y un aumento en la duración de los ciclos en comparación con mujeres con IMC indicativo de normopeso [180]. Por otra parte, en las mujeres con un IMC  $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ , el riesgo de alteraciones ovulatorias es aún mayor [181,182], además de tener un mayor riesgo relativo de sufrir infertilidad que aquellas con IMC normal, siendo el promedio de tiempo hasta lograr un embarazo mayor en las primeras [182–184]. A su vez, la obesidad impacta negativamente sobre

el éxito de la reproducción asistida, causando disminución de embarazos y de nacidos vivos en este grupo en comparación con las mujeres normopeso [185–187]. Los mecanismos por los cuales ocurren estos trastornos son variados, desde alteraciones hipotalámico-hipofisarias hasta desequilibrios de factores locales dentro del ovario [188]. Estas alteraciones afectan la calidad del ovocito, el desarrollo folicular y la implantación embrionaria. Con respecto a las gonadotrofinas, tanto la FSH como la LH se encontraron disminuidas en pacientes obesas durante todo el ciclo folicular [180,189].

Cabe destacar que existe una gran variabilidad en los estudios en humanos debido a la presencia de múltiples factores que pueden influir en los parámetros reproductivos (tanto ambientales como genéticos), lo que puede ocasionar resultados controversiales. Es por esto que el uso de modelos animales que mimeticen trastornos metabólicos, resulta de suma utilidad para estudios de fertilidad [190,191]. Muchos de estos modelos son realizados a partir de la utilización de ratones knockout para determinados genes, como por ejemplo aquellos deficientes en LPL (lipoproteína lipasa), que permiten el estudio de trastornos como la hiperlipidemia y la resistencia a la insulina; o ratones LDLR<sup>-/-</sup>, que no expresan el receptor de LDL, lo que los lleva a desarrollar aterosclerosis y niveles elevados de colesterol. Otros, como los ratones ob/ob, tienen una mutación en el gen de la leptina, lo que causa obesidad mórbida y DT2. Sin embargo, no todos los modelos implican alteraciones a nivel genético. La administración de dietas altas en grasas (DAG), en azúcares o en ambas, son un modelo aceptado y extensamente utilizado en investigación. Entre ellas, algunos autores utilizan las llamadas dieta de cafetería, en donde permiten a los animales el consumo *ab libitum* de alimentos ultra procesados comúnmente consumidos por los humanos. Otras dietas, presentan un porcentaje de Kcal definido. Para ser considerada una dieta saludable, se recomienda que la ingesta de energía obtenida de fuentes de grasa esté por debajo del 30% de las calorías

[192,193]. Muchos estudios que evalúan el efecto reproductivo de una DAG, han utilizado dietas que contienen un 60% de calorías provenientes de grasas, también conocidas como dietas muy altas en grasas (DMAG), lo cual duplica el máximo recomendado. Otras, como la aplicada en este estudio, contienen un 45% de calorías provenientes de fuentes de grasa, lo cual permite evaluar posibles alteraciones causadas por una dieta más frecuentemente consumida por las mujeres, aunque ésta no siempre conduce a obesidad.

Muchas de las consecuencias en la salud provocadas por los trastornos metabólicos previamente descriptos, logran ser mejoradas e incluso revertidas a partir de la adopción de un estilo de vida saludable y la pérdida de peso. Los objetivos a largo plazo son la prevención de la DT2 y de las complicaciones cardiovasculares [194]. Sin embargo, cuando el cambio de hábitos se dificulta o resulta insuficiente, el uso de fármacos, se presenta como una opción necesaria. En esta línea, la administración de metformina para bajar los niveles de glucosa en sangre es un tratamiento efectivo, que, en algunos casos, mejora además otras comorbilidades asociadas a la hiperglucemia, como por ejemplo el sobrepeso. Teniendo en cuenta que metformina impacta sobre el sistema reproductor femenino, su utilización para revertir las potenciales consecuencias negativas de la DAG, podría convertirse en una herramienta terapéutica para patologías reproductivas en mujeres que tienen asociadas patologías metabólicas.

Como ya fue mencionado anteriormente, los desbalances metabólicos suceden a edades cada vez más tempranas solapándose con la edad reproductiva de las mujeres. Es por esto que resulta también muy importante estudiar los efectos de la exposición a una DAG en la descendencia. Si bien numerosos trabajos presentaron evidencia sobre consecuencias metabólicas [195,196] y neurológicas [197] en la progenie de madres alimentadas con DAG durante la gestación y lactancia, los trabajos que analizan efectos a nivel reproductivo son escasos, y los resultados obtenidos son muchas veces controversiales y difíciles de comparar, al

ser realizados en modelos experimentales muy diferentes entre sí [198,199]. Por otro lado, hasta el momento, no hay trabajos que evalúen la utilización de fármacos para mejorar o intentar revertir las consecuencias reproductivas negativas provocadas en la descendencia por exposición a la DAG *in utero* y durante la lactancia. Es por esto que nos propusimos estudiar el efecto de la DAG sobre parámetros reproductivos de la descendencia en la adultez, y analizamos si, en caso de observar alteraciones, metformina podría prevenirlas al ser administrada a las madres durante la preñez. En caso de observarse efectos beneficiosos de la metformina en la descendencia, resultaría prometedora su utilización como herramienta terapéutica para evitar daños en la progenie debido a los hábitos alimenticios de la madre.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

Debido a lo expuesto, se postuló la siguiente **hipótesis**:

« *La ingesta de una dieta alta en grasas genera alteraciones metabólicas que afectan al ovario y a la fertilidad femenina. La utilización de metformina logra mitigar y/o revertir las consecuencias observadas.* »

« *La exposición a una dieta alta en grasas in utero y durante la lactancia afecta al metabolismo, al ovario y la fertilidad de la descendencia. El tratamiento con metformina de las madres mejora las alteraciones observadas en las crías.* »

Para ello se plantearon los siguientes **objetivos generales**:

- A. Estudiar el efecto *in vivo* que produce la administración de una dieta alta en grasas, con o sin la administración de metformina, sobre la funcionalidad ovárica y la reproducción de ratones hembra.
- B. Estudiar los efectos sobre el metabolismo y la reproducción en las crías hembra de animales que ingieren dieta alta en grasas, con o sin la administración de metformina, durante la preñez y la lactancia.

De acuerdo con los objetivos generales, se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

**A.** Estudiar en un modelo de dieta alta en grasas a hembras en edad fértil que reciben o no metformina:

- El peso corporal de los animales
- El peso del tejido adiposo gonadal y mesentérico
- La presencia de esteatosis hepática
- La concentración sérica de glucosa y su metabolización
- La concentración sérica de insulina
- El valor del índice HOMA-IR
- La concentración sérica de triglicéridos y colesterol total
- Las concentraciones séricas de progesterona, estradiol y las enzimas ováricas involucradas en su síntesis.
- La concentración sérica de FSH y LH
- El ciclo estral.
- El desarrollo folicular
- El daño genómico en células ováricas
- La deposición de colágeno
- El desarrollo y la estabilidad vascular en el ovario
- Los niveles ováricos de factores angiogénicos: VEGF, ANGPT2, PDGF-BB
- La fertilidad natural y la fertilización *in vitro*

**B.** Estudiar en las crías hembra de animales que ingieren dieta grasa con o sin la administración de metformina durante la preñez y la lactancia:

- El peso corporal
- El peso del tejido adiposo gonadal y mesentérico
- La concentración sérica de glucosa y su metabolización
- La concentración sérica de FSH y LH
- El ciclo estral.
- El desarrollo folicular
- El desarrollo y la estabilidad vascular en el ovario
- Los niveles ováricos de factores angiogénicos: VEGF, ANGPT2, PDGF-BB
- La fertilidad natural



## Capítulo 2 A

Metformina en condiciones patológicas:

Animales tratados

## **METODOLOGÍA**

### **MODELO ANIMAL**

Los ratones fueron cuidados y alojados en el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME), Buenos Aires, Argentina. Se les permitió acceso *ad libitum* a alimento y agua, y se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Los ratones C57BL/6 (de 21 días de edad) fueron alimentados durante 15 semanas con una dieta regular de bioterio (**grupo Control**) (24 g de proteína/100 g de alimento, 32 g de carbohidratos/100 g de alimento, 20% de Kcal de grasa; GEPSA FEEDS, Grupo Pilar S.A., Argentina) o con una dieta alta en grasas (DAG) (24 g de proteína/100 g de alimento, 41 g de carbohidratos/100 g de alimento, 45% de Kcal de grasa; D12451; Research Diets, New Brunswick, USA). El peso corporal, el consumo de alimento y el consumo de agua se determinaron una vez por semana. A las 11 semanas, se midió la glucemia y los animales DAG se dividieron aleatoriamente en dos grupos. Uno de ellos recibió metformina por vía oral (sc-202000C, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), disuelta en agua de bebida, durante 4 semanas (**grupo DAG+Met**). La dosis de metformina (300 mg/kg) fue equivalente a la dosis recibida por pacientes [105] y se ajustó semanalmente teniendo en cuenta el peso corporal de los ratones y la cantidad de agua consumida. El grupo DAG continuó recibiendo solo agua (**grupo DAG**). El ciclo estral se determinó en algunos animales de cada grupo experimental durante las últimas dos semanas. A las 15 semanas, los ratones de los tres grupos se dividieron aleatoriamente en 3 subgrupos.

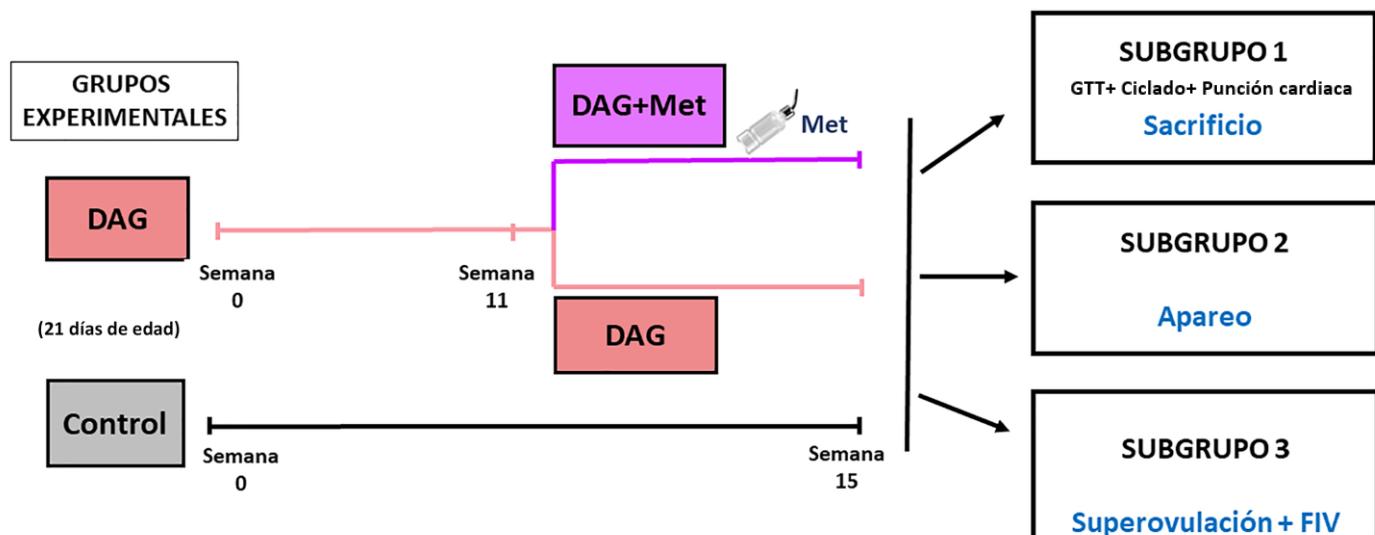
En el primer subgrupo, se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa (GTT). Aquellos animales que se encontraban en el estadio del ciclo proestro/estro fueron anestesiados y se les extrajo sangre por punción directa del corazón, previo al sacrificio. Una vez coaguladas las muestras y después de la centrifugación, el suero resultante se almacenó a -80°C. A continuación, se extrajeron los ovarios y los mismos fueron limpiados de tejido graso adherente, procediendo a

congelar uno de ellos y a fijar el otro en solución de Bouin (Biopur Diagnostics) para el análisis histológico posterior. También se extrajo y pesó el tejido adiposo mesentérico y gonadal de los animales. Los hígados fueron aislados, fijados y teñidos con H&E.

El segundo subgrupo fue apareado con ratones machos C57BL/6 de fertilidad comprobada. El día 1 de preñez se determinó mediante la detección del tapón vaginal, resultado de la cópula. Los tratamientos se mantuvieron durante toda la preñez. Se estudió el tiempo que tardaron en lograr la preñez, el número de crías por camada y el peso corporal de las mismas.

Por último, el tercer subgrupo de animales fue sometido a una fertilización *in vitro* (FIV).

La Figura 23 muestra un diagrama esquemático del diseño experimental.



**Figura 23. Diagrama esquemático del diseño experimental.** DAG: Grupo dieta alta en grasas; DAG+Met: Grupo dieta alta en grasas+metformina; FIV: Fertilización *in vitro*.

## **TÉCNICAS**

Las técnicas de ciclado, GTT, medición hormonal, inmunohistoquímica, western blot, recuento folicular, apareo y FIV fueron realizadas según lo descripto en el capítulo 1 A.

### **Parámetros metabólicos**

Además de las mediciones ya descriptas en el capítulo 1 A, a partir de las concentraciones de insulina y de glucosa se calculó el índice HOMA-IR como insulina en ayunas (mU/ml) x Glucosa en ayunas (mmol/L) / 22.5. Los niveles totales de colesterol en suero (Colestest enzimático AA; catálogo 870360022/01) y triglicéridos (TG Color GPO/PAP AA; catálogo 870920022/01) se midieron utilizando kits de laboratorio Wiener, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### **Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software estadístico Prism v6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.). Los datos se expresan como la media ± SEM. La normalidad se probó con una prueba de Kolmogorov-Smirnov. Luego, las diferencias significativas se analizaron con ANOVA, seguido de la prueba de Newman-Keuls o de Kruskal-Wallis, según la normalidad. La significancia estadística se definió como  $p < 0.05$ .

## **RESULTADOS**

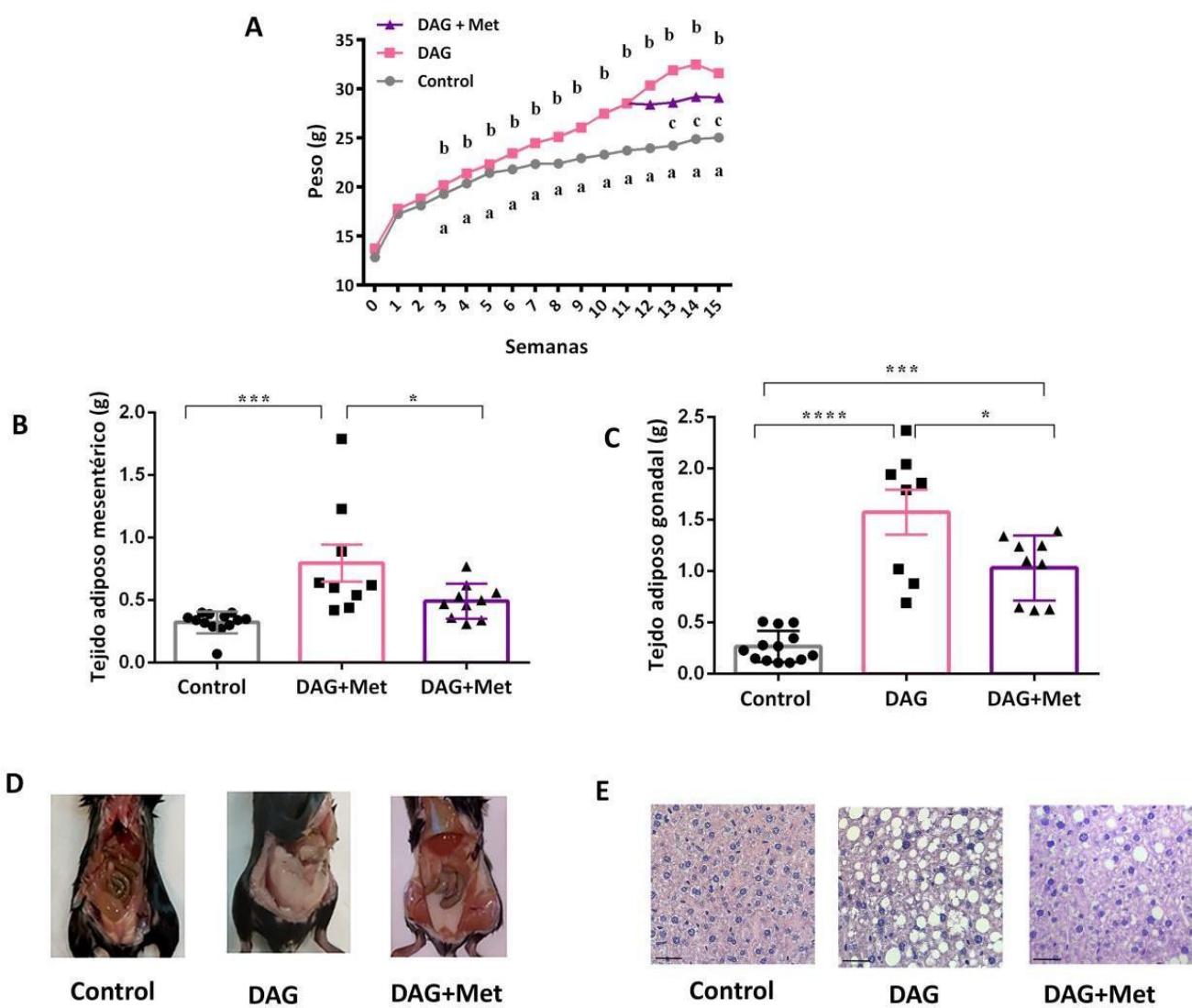
### **Efecto de la dieta alta en grasas y metformina en parámetros metabólicos**

Para caracterizar los efectos de la ingesta de la DAG y la administración de metformina en el metabolismo, pesamos a los animales una vez por semana ( $n=18-27$ ). Desde la semana 3 hasta la semana 15 de administración de DAG, los animales DAG mostraron un peso corporal significativamente mayor en comparación con los animales Control (Control:  $17,3 \pm 0,2$  g; DAG:  $17,8 \pm 0,2$  g;  $p < 0,05$ ). Una semana después del inicio de la administración de metformina, este aumento de peso se detuvo en el grupo DAG+Met (DAG:  $31,9 \pm 1,1$  g; DAG+Met:  $28,6 \pm 0,6$  g,  $p < 0,05$ ) (Figura 24 A). Luego de la eutanasia, también observamos que tanto el tejido adiposo gonadal ( $n=8-13$ ) como el mesentérico ( $n=9-13$ ) aumentaron en el grupo DAG ( $p < 0,001$  vs Control) y que el tratamiento con metformina revirtió este aumento (mesentérico:  $p < 0,05$  vs DAG; gonadal:  $p < 0,01$  vs DAG) (Figura 24 B-D). Las secciones de hígado teñidas con Hematoxilina-Eosina de ratones Control mostraron una estructura bien organizada, mientras que las de los grupos DAG y DAG+Met mostraron signos de esteatosis, con presencia de gotas lipídicas (Figura 24 E).

La glucemia se midió antes ( $n=8$ ) y después ( $n=8-10$ ) del tratamiento con metformina. Los animales DAG mostraron niveles más altos de glucosa en sangre en ambos momentos ( $p < 0,05$  vs Control) y la administración de metformina redujo esta alteración a valores similares al Control ( $p > 0,05$  vs Control) (Tabla 4). Para estudiar la metabolización de la glucosa, realizamos una prueba de tolerancia a la glucosa (GTT) ( $n=9-10$ ). Observamos que los animales DAG tenían mayor área bajo la curva ( $p < 0,001$  vs Control), mientras que la administración de metformina revirtió este efecto ( $p < 0,05$  vs DAG) (Tabla 4).

El colesterol total en suero fue mayor en los animales DAG y DAG+Met ( $n=9-10$ ) (DAG:  $p < 0,01$

vs Control; DAG+Met:  $p < 0,001$  vs Control), pero no se encontraron diferencias significativas en los niveles de triglicéridos ( $n=8-10$ ) e insulina ( $n=5-6$ ) entre los grupos (Tabla 4). La relación entre la insulina y la glucosa nos permitió calcular el índice HOMA-IR ( $n=5-6$ ), que se encontró aumentado en los animales DAG ( $p < 0,05$  vs Control), sugiriendo un posible estado de resistencia a la insulina. El tratamiento con metformina mejoró la alteración de este índice ( $p > 0,05$  vs Control) (Tabla 4).



**Figura 24. Peso corporal, tejido adiposo y morfología hepática en los grupos Control, DAG y DAG+Met** (A) Ganancia de peso corporal durante las 15 semanas del experimento *in vivo*. (B) Peso del tejido adiposo mesentérico. (C) Peso del tejido adiposo gonadal. (D) Fotografías representativas que muestran el tejido adiposo en la semana 15. (E) Microfotografías representativas que muestran secciones hepáticas de animales de todos los grupos experimentales. Escala: 25  $\mu\text{m}$ . Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,001$ . Las letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Tabla 4: Parámetros metabólicos y hormonales de animales Control, DAG y DAG+Met en la semana 15.

Parámetros	Control	DAG	DAG+Met
Glucemia Pre Met (mg/dL)	134.3 ± 2.9 <sup>a</sup>	153.4 ± 7.7 <sup>b</sup>	-
Glucemia Post Met (mg/dL)	131.9 ± 7.8 <sup>a</sup>	163.8 ± 8.4 <sup>b</sup>	152.4 ± 3.3 <sup>ab</sup>
ABC (min*mg/dL)	22245± 1062 <sup>a</sup>	29097 ± 1557 <sup>b</sup>	25670 ± 684 <sup>c</sup>
Colesterol Total (g/L)	0.40 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.54 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.60 ± 0.03 <sup>b</sup>
Trigliceridos (g/L)	0.34 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.27 ± 0.02
Insulina (ng/mL)	0.13 ± 0.01	0.17 ± 0.02	0.14 ± 0.01
Indice HOMA IR	0.97 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.7 ± 0.3 <sup>b</sup>	1.3 ± 0.1 <sup>ab</sup>
Estradiol (pg/mL)	81.17 ± 4.78	69.36 ± 4.43	74.78 ± 5.35
Progesterona (ng/mL)	7.29 ± 0.66 <sup>a</sup>	10.44 ± 0.81 <sup>b</sup>	6.36 ± 0.37 <sup>a</sup>
LH (ng/mL)	16.24 ± 2.14	13.5 ± 2.13	13.75 ± 1.56
FSH (ng/mL)	159.4 ± 20.7	143.6 ± 22.7	153.5 ± 29.4

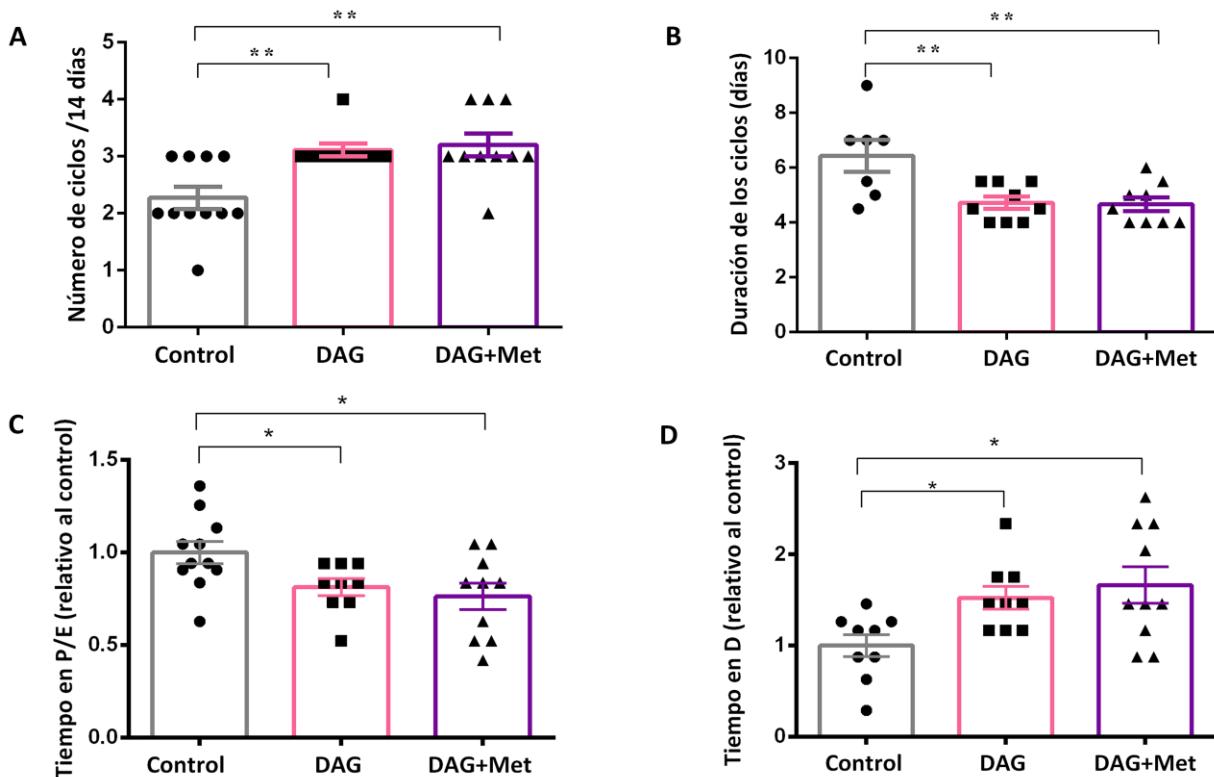
Los datos están expresados como la media ± SEM. Se utilizó ANOVA seguido de Newman-Keuls's post-test para la comparación entre grupos. La significancia estadística fue definida como p<0,05. Letras distintas representan diferencias significativas.

## Efecto de la dieta alta en grasas y metformina en el ciclo estral y en la producción hormonal

A continuación, analizamos si la ingesta de la DAG causaba alguna alteración en el ciclo estral.

Estudiamos el número ( $n=9-11$ ) y la duración de los ciclos ( $n=7-9$ ) y encontramos que los animales DAG tenían ciclos más cortos que los animales Control, lo que llevó a una mayor cantidad de ciclos totales en el período analizado ( $p < 0,01$  vs Control) (Figura 25 A y B). También evaluamos la proporción de tiempo que los ratones pasaron en cada etapa del ciclo ( $n=9-10$ ). Los animales DAG pasaron más días en los estadios anovulatorios diestro y menos días en los estadios ovulatorios proestro y estro ( $p < 0,05$  vs Control). La administración de metformina no tuvo efecto en ninguno de estos parámetros ( $p > 0,05$  vs DAG) (Figura 25 C-D).

Dado que se sabe que las alteraciones metabólicas causan alteraciones hormonales, estudiamos los niveles séricos de FSH ( $n=8-10$ ), LH ( $n=8-9$ ), progesterona ( $n=5-9$ ) y estradiol ( $n=6-7$ ). Los animales DAG mostraron niveles elevados de progesterona ( $p < 0,01$  vs Control), lo cual fue revertido por la administración de metformina ( $p < 0,01$  vs DAG). No se encontraron diferencias en los niveles de estradiol, FSH o LH entre los grupos ( $p > 0,05$ ) (Tabla 4).

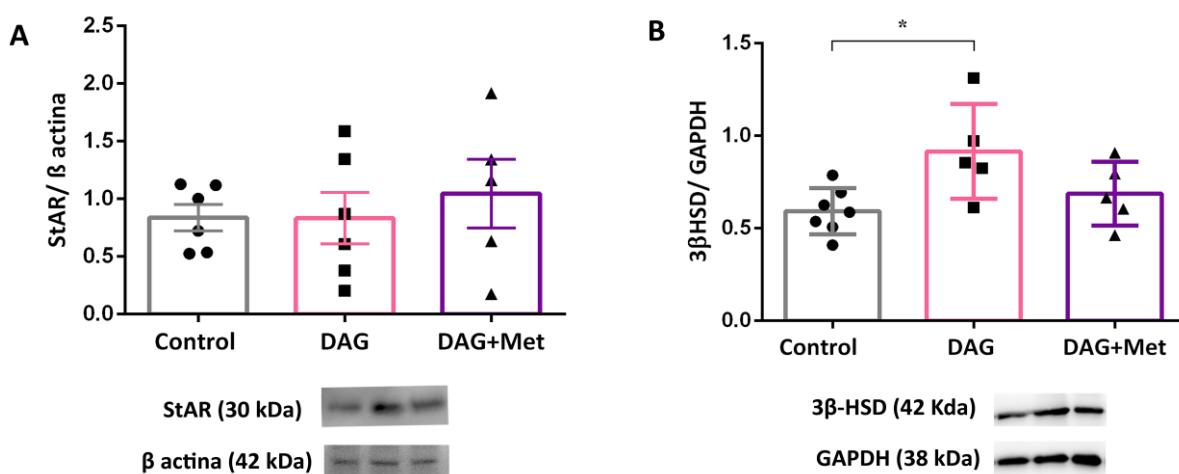


**Figura 25. Efecto de la dieta alta en grasas y el tratamiento con metformina en el ciclo estral.**

(A) Número de ciclos en 14 días. (B) Duración del ciclo. (C) Tiempo transcurrido en las fases de proestro y estro con respecto al control. (D) Tiempo transcurrido en las fases de Diestro I y Diestro II con respecto al control. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

#### **Efecto de la dieta alta en grasas y metformina en la expresión de proteínas esteroidogénicas**

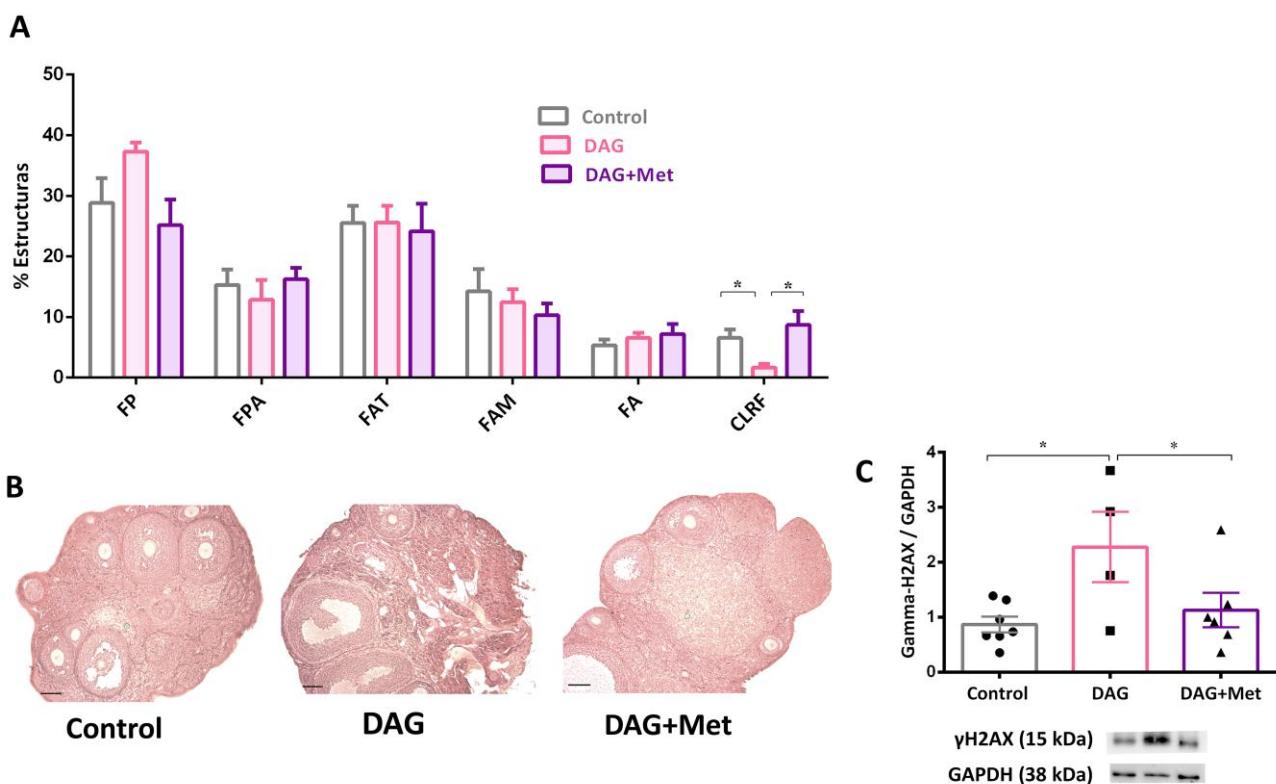
Posteriormente, analizamos la expresión de dos proteínas clave involucradas en la esteroidogénesis ovárica, StAR ( $n=5-6$ ) y  $3\beta$ HSD ( $n=5-7$ ). Como se ilustra en la Figura 26 A, no hubo diferencias en la expresión de StAR ( $p > 0,05$  entre los grupos). Sin embargo,  $3\beta$ HSD, la enzima que convierte la pregnenolona en progesterona, fue mayor en los animales DAG ( $p < 0,05$  vs Control), mientras que la metformina redujo estos niveles a valores similares al grupo Control ( $p > 0,05$  vs Control) (Figura 26 B).



**Figura 26. Efecto de la dieta alta en grasas y el tratamiento con metformina en las proteínas esteroidogénicas.** Análisis densitométricos de las proteínas (A) StAR y (B)  $3\beta$ HSD en lisados ováricos mediante Western Blot. La densidad de cada banda se normalizó a la densidad de las bandas de GAPDH o  $\beta$ -actina. Los paneles inferiores muestran bandas representativas de cada proteína analizada. Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). \* $p < 0,05$ .

## Efecto de la dieta alta en grasas y metformina en el desarrollo folicular

Como se muestra en la Figura 27, determinamos el porcentaje de estructuras en cada estadio folicular en secciones histológicas teñidas con H&E ( $n=6-9$ ). No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de ninguna estructura folicular entre los grupos. Sin embargo, el porcentaje de cuerpos lúteos recién formados fue menor en los animales DAG ( $p < 0,05$  vs Control). El tratamiento con metformina aumentó este porcentaje a valores similares al Control ( $p < 0,05$  vs DAG) (Figura 27 A). Para analizar el impacto de la DAG y la administración de metformina en el daño al ADN, medimos el marcador molecular  $\gamma$ H2AX ( $n=5-7$ ). Curiosamente, los resultados mostraron que la expresión de  $\gamma$ H2AX fue significativamente mayor en los animales DAG comparado con los animales Control ( $p < 0,05$  vs Control) y que el tratamiento con metformina revirtió esta alteración ( $p < 0,05$  vs DAG) (Figura 27 C).



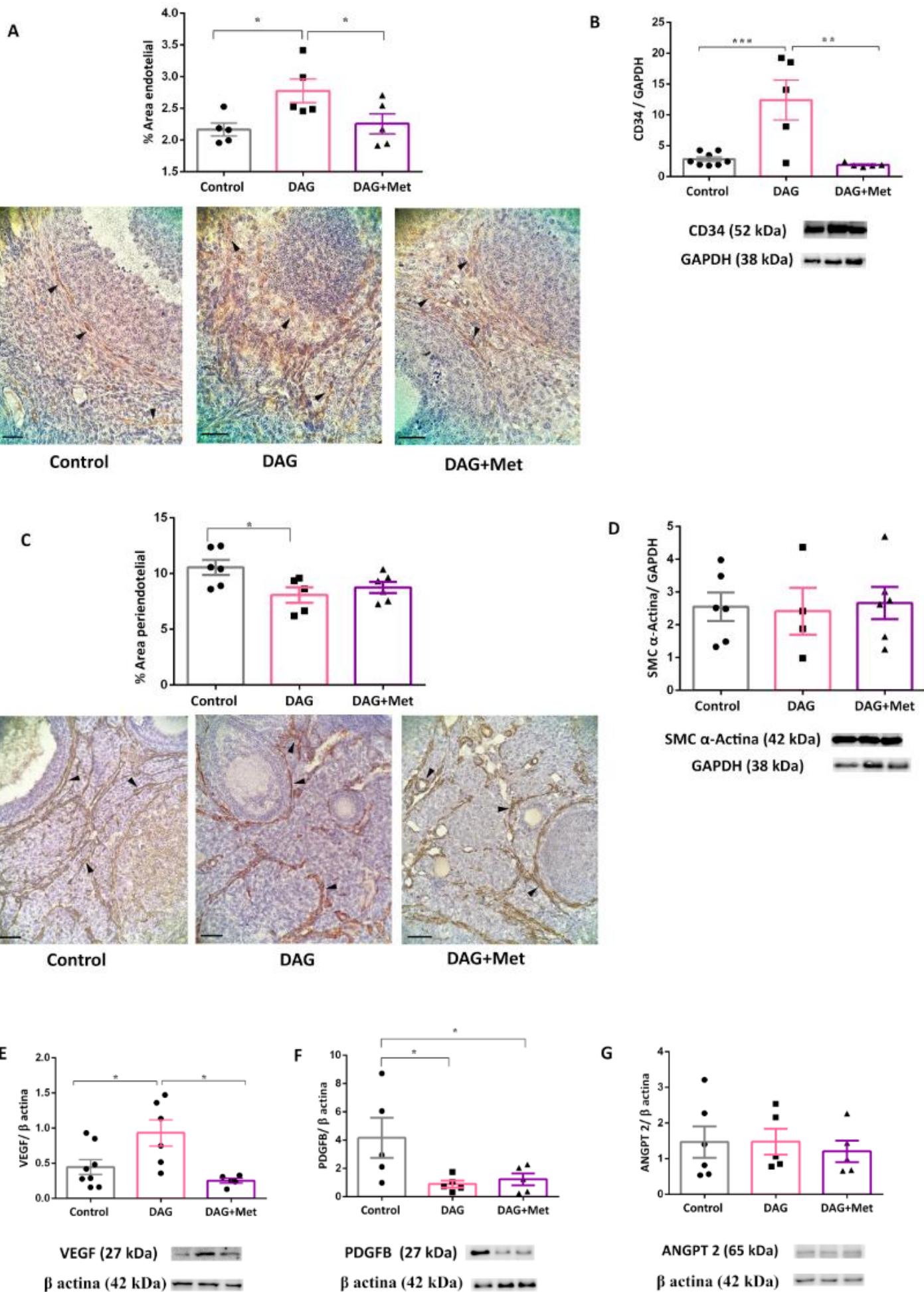
**Figura 27. Efecto de la dieta alta en grasas y el tratamiento con metformina en el desarrollo folicular y en el daño al ADN.** (A) Porcentaje de cada estructura en secciones ováricas teñidas con H&E. FP: Folículo primario. FPA: Folículo preantral. FAT: Folículo antral temprano. FAM: Folículo antral maduro. FA: Folículo atrésico. CLRF: Cuerpo lúteo recientemente formado. (B) Secciones ováricas representativas teñidas con H&E. Barras de escala, 100 µm. (C) Marcador de daño en el ADN γ-H2AX, en lisados ováricos medido por Western Blot. La densidad de cada banda se normalizó a la densidad de las bandas de GAPDH. Los paneles inferiores muestran bandas representativas de cada proteína. Los datos se expresan como la media ± SEM. \*p < 0,05.

### **Efecto de la dieta alta en grasas y metformina en la densidad y estabilidad vascular**

Dado que la calidad del ovocito depende en gran medida de un desarrollo vascular adecuado, evaluamos si el tratamiento con la DAG y con metformina afectaba la formación y estabilidad del sistema vascular. En primer lugar, estudiamos la expresión de CD34 (n=5) (marcador de células endoteliales). Observamos una mayor expresión en el grupo DAG (p < 0,001 vs Control), lo cual se restableció en el grupo DAG+Met (p < 0,01 vs DAG) (Figura 28 A-B).

La expresión de alfa-actina en células musculares lisas (marcador de periendotelio vascular) fue ligeramente menor en los animales DAG cuando se analizó por inmunohistoquímica (n=5-6) (p < 0,05 vs Control) pero no se observaron cambios cuando se analizó mediante Western blot (n=5-6) (Figura 28 C-D).

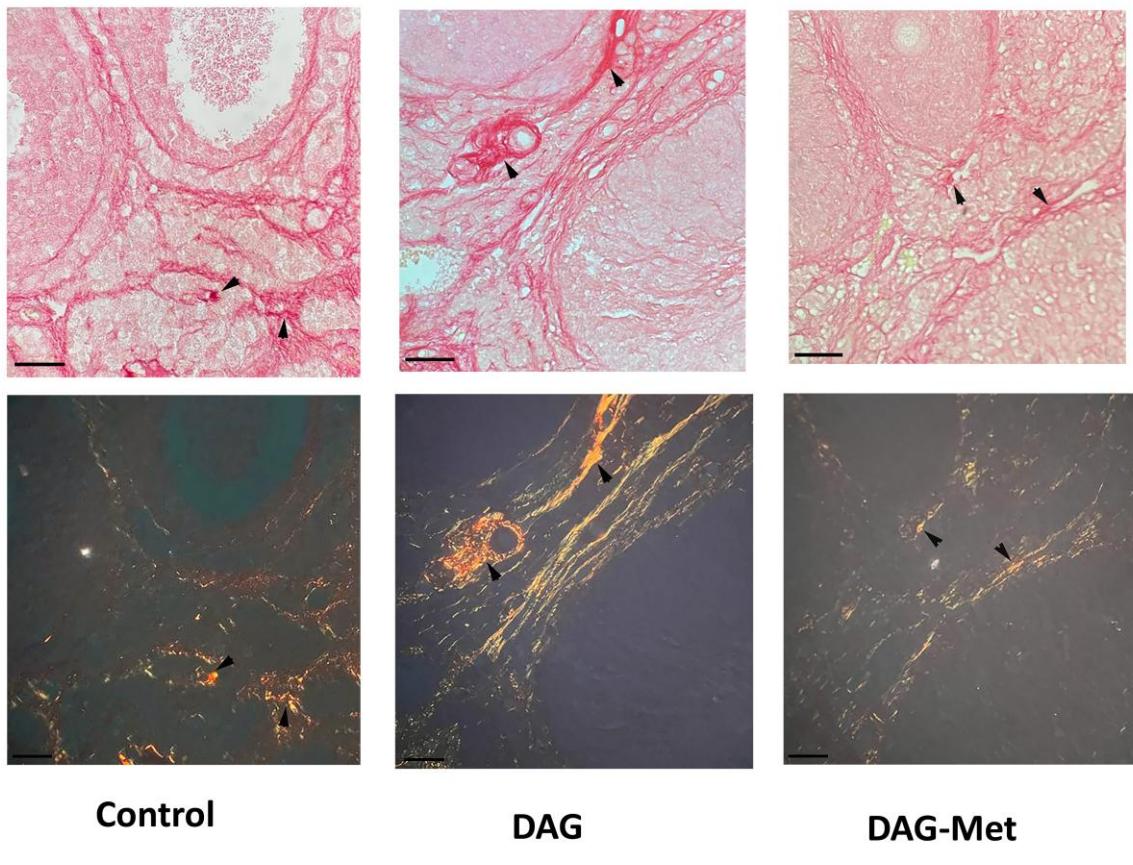
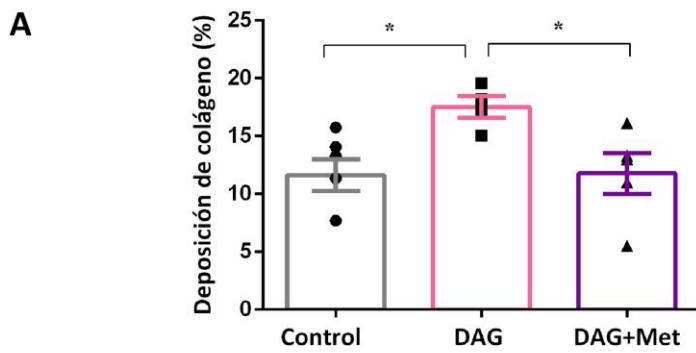
A continuación, estudiamos la expresión de los factores angiogénicos más importantes. VEGF se mostró aumentado en el grupo DAG (n=5-8) (p < 0,05 vs Control), mientras que metformina revirtió este efecto (p < 0,05 vs DAG) (Figura 28 E). Luego, analizamos los niveles de dos factores angiogénicos involucrados en la estabilidad de los vasos: PDGF-B (n=5) y angiopoyetina-2 (n=5-6). PDGF-B disminuyó en el grupo DAG sin efecto de la metformina (p < 0,05 vs Control) (Figura 28 F). El nivel de angiopoyetina-2 permaneció sin alteraciones entre los grupos (Figura 28 G).



**Figura 28. Angiogénesis ovárica en los grupos control, DAG y DAG+Met.** (A) Inmunotinción de células endoteliales con anticuerpo anti-CD34. El gráfico muestra la cuantificación del área de células endoteliales en los ovarios de animales de los tres grupos analizados. Los paneles inferiores muestran secciones histológicas representativas de ovarios control, DAG y DAG+Met marcados con anticuerpo anti-CD34. Se analizaron cuatro secciones por ovario. Las flechas muestran tinción positiva. Barra de escala: 50 µm; magnificación de 600X. (B) Análisis densitométrico del marcador endotelial CD34. (C) Inmunotinción de células periendoteliales con anticuerpo anti-alfa-actina de músculo liso. El gráfico muestra la cuantificación del área de células periendoteliales en los ovarios de animales de los tres grupos analizados. Los paneles inferiores muestran secciones histológicas representativas de ovarios control, DAG y DAG+Met marcados con anticuerpos anti-alfa-actina de músculo liso. Se analizaron cuatro secciones por ovario. Las flechas muestran tinción positiva. Barras de escala: 50 µm; magnificación de 600X. (D) Análisis densitométrico del marcador de células periendoteliales alfa-actina de músculo liso. (E) Análisis densitométrico de VEGF. (F) Análisis densitométrico de PDGFB. (G) Análisis densitométrico de ANGPT2. Para Western blots, la densidad de cada banda se normalizó a las bandas de GAPDH o β-actina. Los paneles inferiores muestran bandas representativas de cada proteína analizada. Los datos se expresan como la media ± SEM. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001.

### **Efecto de la dieta alta en grasas y metformina en la deposición de colágeno**

Analizamos la fibrosis ovárica estudiando la deposición de las fibras de colágeno. Observamos mediante tinción con PSR (n=5-6) un aumento de la fibrosis en el grupo DAG ( $p < 0,05$  vs Control). Sin embargo, los ovarios de ratones DAG+Met mostraron niveles más bajos de tinción con PSR respecto a los ovarios DAG ( $p < 0,05$  vs DAG) (Figura 29 A).



**Figura 29. Deposición de colágeno en los grupos Control, DAG y DAG+Met.** Deposición de colágeno analizada mediante tinción con picrosirius red (PRS). El gráfico muestra el % de área teñida. Los paneles inferiores muestran imágenes representativas de PRS en campo claro (paneles superiores) y microscopía de luz polarizada (paneles inferiores) de los tres grupos experimentales. Las flechas muestran tinción positiva de PSR. Barra de escala: 50  $\mu$ m; magnificación de 600X. \* $p < 0,05$ .

### **Efecto de la dieta alta en grasas y metformina en parámetros de fertilidad**

Para evaluar el efecto de la ingesta de DAG y la administración de metformina en el rendimiento reproductivo de los ratones, apareamos hembras con machos C57BL/6 de fertilidad comprobada. Las hembras DAG requirieron más tiempo para lograr la preñez ( $p < 0,05$  vs Control), mientras que en el grupo DAG+Met el tiempo fue similar al de los ratones Control ( $p < 0,05$  vs DAG) ( $n=6-8$ ) (Tabla 5). También analizamos el número de crías por camada ( $n=6-9$ ), que fue menor en los animales DAG ( $p < 0,05$  vs Control), observando una mejora en el grupo DAG+Met ( $p > 0,05$  vs Control) (Tabla 5). No se encontraron cambios en el peso promedio de las crías ( $n=53-83$ ) ( $p > 0,05$  entre los grupos). Sin embargo, el peso total de la camada fue menor en los animales DAG ( $p < 0,05$  vs Control), reducción que se mejoró con la administración de metformina ( $p > 0,05$  vs Control) ( $n=6-7$ ) (Tabla 5).

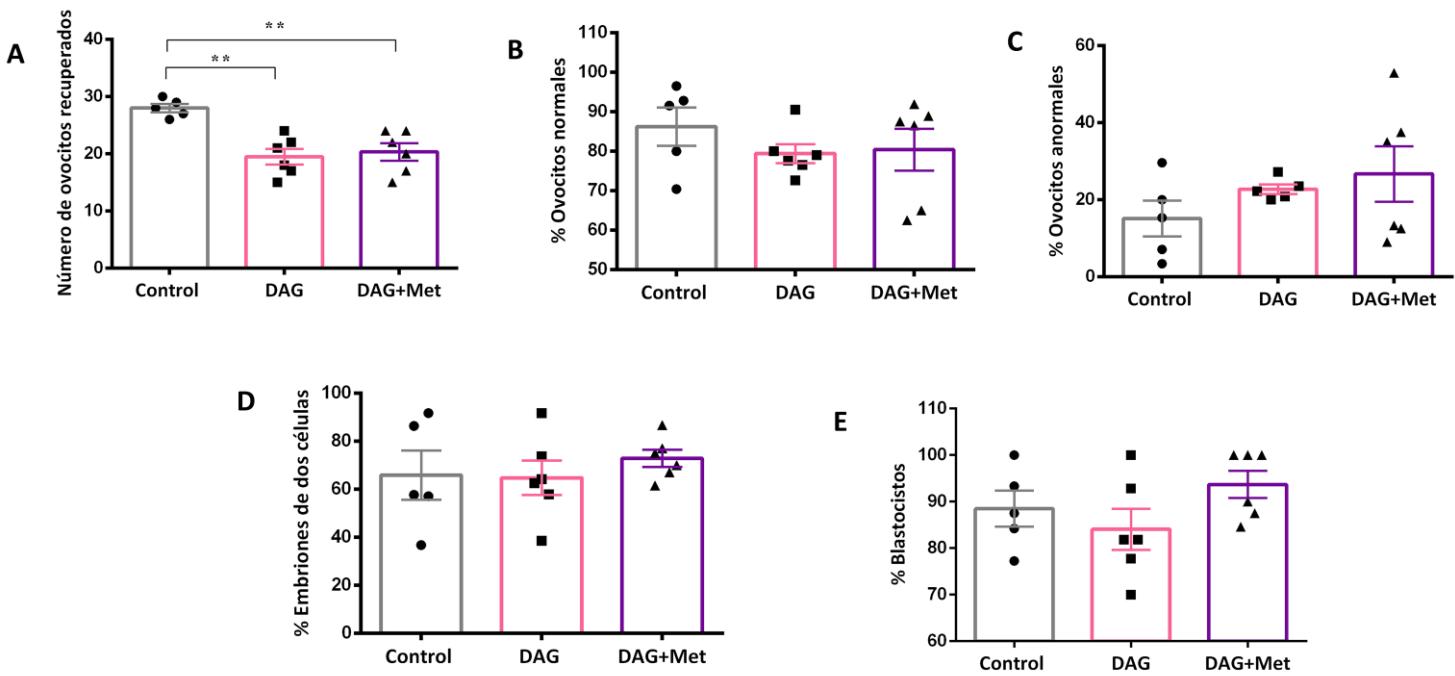
Tabla 5: Fertilidad natural de animales Control, DAG y DAG+Met con ratones macho C57BL/6.

	Control	DAG	DAG+Met
Tiempo hasta lograr preñez (días)	$4.4 \pm 1.0^a$	$14.1 \pm 4.0^b$	$5.5 \pm 1.7^a$
Número de crías por camada	$10.0 \pm 0.5^a$	$6.7 \pm 0.5^b$	$9.0 \pm 1.2^{ab}$
Peso promedio de las crías (g)	$1.48 \pm 0.01$	$1.45 \pm 0.02$	$1.43 \pm 0.02$
Peso total de la camada (g)	$15.2 \pm 0.6^a$	$11.2 \pm 1^b$	$12.6 \pm 1.3^{ab}$

Los datos están expresados como la media ± SEM. Se utilizó ANOVA seguido de Newman-Keuls's post-test para la comparación entre grupos. La significancia estadística fue definida como p<0,05. Letras diferentes representan diferencias significativas.

### **Efecto de la dieta alta en grasas y metformina en la calidad ovocitaria y la fertilización *in vitro* (FIV)**

Posteriormente, analizamos el efecto de la ingesta de la DAG y de metformina en la fertilización *in vitro* (n=5-6). Encontramos un menor número de ovocitos recuperados en los grupos DAG y DAG+Met ( $p < 0,01$  vs Control) (Figura 29 A). Sin embargo, no se encontraron diferencias en el porcentaje de ovocitos normales y anormales, embriones de dos células y formación de blastocistos ( $p > 0,05$  entre los grupos) (Figura 29 B-E).



**Figura 30. Análisis de la calidad ovocitaria y ensayo de fertilización *in vitro*.** (A) Número de ovocitos recuperados. (B) Porcentaje de ovocitos normales en relación a la cantidad de ovocitos recuperados. (C) Porcentaje de ovocitos anormales en relación a la cantidad de ovocitos recuperados. (D) Porcentaje de ovocitos normales que alcanzaron la etapa de embrión de dos células. (E) Porcentaje de embriones de dos células que alcanzaron la etapa de blastocisto (%). Los datos se expresan como la media ± el error estándar de la media (SEM). \*p < 0,05, \*\*p < 0,01.

## **DISCUSIÓN**

En los últimos años, muchas mujeres se han visto afectadas por el consumo de una dieta occidental, rica en grasas saturadas, carbohidratos refinados y sodio, y pobre en vegetales y micronutrientes. Está claro que los efectos de la ingesta de esta dieta no se limitan a trastornos metabólicos, sino que también afectan a otros órganos y sistemas, dando lugar a diversas disfunciones aparentemente no relacionadas. En cuanto a la fertilidad femenina, los factores de riesgo metabólicos, especialmente la obesidad, se han asociado extensamente con la subfertilidad, trastornos menstruales, mayor tasa de abortos espontáneos y peores resultados en el embarazo [179,200,201]. También hay evidencia de que la ingesta de una DAG, independientemente de la obesidad, afecta la fertilidad femenina [202]. A pesar de todos los estudios realizados tanto en modelos animales como en mujeres, los mecanismos por los cuales la ingesta de una DAG afecta la función reproductiva no se comprenden completamente. En este estudio, encontramos que los ratones expuestos a una DAG desde la pubertad hasta la adultez, además de alteraciones metabólicas, también presentan parámetros anormales de fertilidad y angiogénesis ovárica. La angiogénesis alterada probablemente sea uno de los mecanismos involucrados en la disfunción ovárica. Además, encontramos que la metformina puede restaurar parcialmente las alteraciones observadas en los animales.

Primero caracterizamos las alteraciones metabólicas en nuestro modelo experimental de ratones alimentados con DAG (45% Kcal grasa) con o sin metformina. La metformina detuvo el aumento de peso corporal inducido por la administración de DAG y disminuyó el peso del tejido adiposo gonadal y mesentérico. El tejido adiposo gonadal participa en la funcionalidad del ovario al actuar como un órgano paracrino que regula la angiogénesis ovárica y la foliculogénesis [203,204], alterando el desarrollo folicular y la ovulación. Por lo tanto, la reducción del tejido adiposo gonadal podría ser uno de los mecanismos por los cuales

metformina regula estos procesos y disminuye los efectos nocivos de la DAG en el ovario.

El ciclo estral se monitoreó en los grupos experimentales durante 14 días. Observamos que los ratones alimentados con DAG tenían ciclos más cortos que aquellos alimentados con la dieta control y que pasaban más tiempo en los estadios diestro y menos en proestro/estro, sin que el tratamiento con metformina tenga efectos significativos. Estos resultados son consistentes con estudios previos que utilizaron una dieta similar [205] y con otros que alimentaron a los animales con dietas muy altas en grasas (DMAG) (60% Kcal grasa) [202,206,207]. Nuestros resultados refuerzan la hipótesis de que cuanto más tiempo se consume una dieta alta en grasas, más afectada se ve la ciclicidad.

Por otro lado, estudiamos la morfología ovárica para comprender si la DAG afecta el desarrollo folicular y la formación de cuerpos lúteos. No encontramos diferencias en la proporción de ninguna estructura folicular ni de folículos atrésicos. Sin embargo, el porcentaje de cuerpos lúteos recién formados disminuyó en el grupo DAG. Curiosamente, metformina aumentó el porcentaje de cuerpos lúteos en animales alimentados con la DAG. Estos resultados sugieren que, en nuestro modelo, los folículos fueron capaces de desarrollarse y que la tasa de atresia no aumenta después del consumo de la dieta. Sin embargo, no lograron ser ovulados adecuadamente y el número de cuerpos lúteos disminuyó respecto a los animales control. Esto es consistente con resultados anteriores obtenidos por Umehara y col., quienes demostraron que los ovarios de ratones obesos tienen menos cuerpos lúteos en comparación con los ovarios de ratones delgados [208].

A continuación, analizamos la expresión del marcador de daño genómico γH2AX, que se mostró aumentado en el grupo DAG. Este marcador permite la detección de las primeras etapas del daño en el ADN [209]. Por lo tanto, aunque no hubo diferencias en el porcentaje de folículos atrésicos, las células ováricas no estaban completamente saludables, lo que podría haber

contribuido a la falla ovulatoria observada en este grupo. En nuestro modelo, la administración de metformina revirtió el aumento en el daño del ADN, lo que sugiere que este medicamento podría proteger a las células de la apoptosis. Se ha demostrado que metformina reduce la apoptosis en células ováricas en diferentes condiciones, como en células de granulosa luteínicas de pacientes con SOP [210], en modelos de ratas y ratones con SOP [211,212], en daño ovárico inducido por ciclofosfamida en ratones [213] y en gallinas ponedoras de edad avanzada [214]. Por otro lado, observamos también un aumento de la fibrosis ovárica en los ovarios de ratones alimentados con la DAG. La fibrosis ovárica ocurre como consecuencia del aumento en la deposición de la matriz extracelular y se ha relacionado con la infertilidad y la menopausia temprana [215]. Metformina fue capaz de revertir este efecto de la dieta, lo cual es consistente con el informe de Landry y col., quienes encontraron que este medicamento previene la fibrosis ovárica asociada con la edad [120]. En conjunto, estos resultados sugieren que metformina protege al ovario del daño en el ADN y de la fibrosis, mejorando como consecuencia la ovulación.

A continuación, medimos los niveles séricos de estradiol y progesterona. Aunque no encontramos diferencias en los niveles de estradiol entre los grupos, los niveles de progesterona fueron más altos en los animales DAG a pesar de la disminución en el porcentaje de cuerpos lúteos. Este aumento en la progesterona sérica se correlaciona con el aumento observado en la enzima esteroidogénica  $3\beta$ -HSD. Niveles elevados de progesterona junto con la ausencia de cambios en el estradiol se describieron previamente en un modelo de rata con obesidad, alimentadas con una DMAG durante 120 o 180 días [216]. Los autores explican que los niveles elevados de insulina podrían aumentar los niveles de  $3\beta$ -HSD en las células ováricas, lo que llevaría a niveles más altos de progesterona. No encontramos niveles más altos de insulina en nuestro modelo, lo que sugiere que otro mecanismo podría estar regulando las

enzimas esteroidogénicas y, por lo tanto, los niveles de hormonas ováricas. Tampoco se encontraron cambios en los niveles de FSH y LH, lo que sugiere que el aumento de progesterona se debe a alteraciones ováricas y no a alteraciones en la señalización de gonadotrofinas. Se necesitan más estudios para dilucidar estos mecanismos.

Metformina revirtió los niveles de  $3\beta$ -HSD a valores similares a los del grupo control, así como la concentración de progesterona. Se ha descripto ampliamente que metformina regula las hormonas ováricas y las enzimas esteroidogénicas en las células de granulosa, principalmente a través de la activación de AMPK [217]. En nuestro modelo *in vivo*, metformina podría estar actuando tanto directamente sobre las células ováricas como a través de una mejora en el estado metabólico del animal. En ambos casos, metformina mejora la esteroidogénesis ovárica, lo que podría mejorar la ovulación en un modelo de dieta grasa que presente disfunción ovulatoria y esteroidogénica.

Por otro lado, se sabe que los vasos sanguíneos están altamente involucrados en la remodelación de los tejidos. Un ejemplo de esto se observa en el crecimiento y la regresión del tejido adiposo en donde la formación de una red de vasos sanguíneos es esencial para que los adipocitos se hipertrofien. Se han encontrado niveles elevados de factores proangiogénicos durante la expansión del tejido adiposo, junto con un aumento de las señales inflamatorias [166]. En el ovario, la angiogénesis es un proceso estrictamente regulado y esencial que permite la nutrición adecuada y la estimulación hormonal de los folículos en crecimiento. Por lo tanto, las alteraciones en la formación de vasos sanguíneos conducen a disfunciones ováricas. Para explorar si la disfunción ovárica observada podría deberse a una angiogénesis ovárica alterada, estudiamos las células endoteliales y periendoteliales de los vasos del ovario. Nuestros resultados sugieren que hay una desregulación en la formación de vasos sanguíneos después de la ingesta de la DAG, con un mayor número de vasos, pero menos maduros y funcionales

debido a una menor cobertura de pericitos y células musculares lisas. Como consecuencia, los folículos podrían estar mal irrigados. Además, los niveles elevados de VEGF en los ovarios de ratones alimentados con DAG también sugiere una falta de irrigación adecuada a los folículos en desarrollo. En primer lugar, VEGF se expresa en respuesta a hipoxia, es decir, cuando las concentraciones de oxígeno en un sistema o tejido en particular son bajas, estas son sensadas por HIF-1 $\alpha$ , quien gatilla la expresión de VEGF, el principal promotor de la angiogénesis [218,219]. En segundo lugar, porque niveles altos de VEGF no acompañados por niveles altos de PDGFB, llevan a la formación de vasos tortuosos, sin células periendoteliales que los estabilicen, que no son funcionales [220]. En relación a esto, se ha informado que los ratones alimentados con una DMAG más fructosa tienen menos vasos en el ovario, lo que podría estar relacionado con un aumento en los niveles de IL-10 [203]. En otro estudio, animales alimentados con DAG durante 20 semanas tenían menos vasos sanguíneos foliculares que animales alimentados con dietas control [221]. En conjunto, estos resultados sugieren que la angiogénesis ovárica está desregulada por la ingesta de la dieta, independientemente de la cantidad de grasa y la duración de la administración de la misma. Esto demuestra que las alteraciones en los factores angiogénicos y la formación de vasos sanguíneos pueden ser un proceso clave en la disfunción ovárica que ocurre después de la ingesta de una DAG.

Metformina regula la angiogénesis ovárica principalmente disminuyendo VEGF y estabilizando el sistema vascular [67,80,83]. En trabajos anteriores en nuestro laboratorio, demostramos que metformina actúa directamente sobre las células de granulosa de rata disminuyendo la expresión de VEGF *in vitro* [67]. En el modelo actual, los ratones que recibieron metformina tienen menos vasos ováricos que el grupo DAG, además de tener menores niveles ováricos de VEGF. Probablemente, la disminución de VEGF fue lo que condujo a la disminución en la formación de vasos sanguíneos. Por otro lado, el número de células periendoteliales alrededor

de estos vasos no difiere del grupo DAG ni del grupo control, lo que sugiere que los vasos ováricos en el grupo de metformina son más maduros y funcionales. Se ha descripto que metformina mejora la angiogénesis ovárica en el SOP [83,222,223], lo que lleva a una mejora en los parámetros de fertilidad. Por lo tanto, sería interesante estudiar sus efectos sobre la fertilidad en mujeres con patologías que presentan desregulación de la angiogénesis ovárica, como alteraciones metabólicas y reproductivas debido a la alta ingesta de grasas.

La fertilidad femenina depende de una función ovárica saludable, donde tanto los factores locales como los sistémicos pueden influir en los resultados reproductivos. Por lo tanto, las alteraciones ováricas no siempre se reflejan en una disminución de la fertilidad, ya que podría haber mecanismos compensatorios que actúen para preservar la reproducción. Es por esto que evaluamos si las alteraciones ováricas observadas en nuestro modelo de DAG condujeron a una disminución de la fertilidad. Al aparear los ratones con machos de fertilidad comprobada, las hembras DAG requirieron más tiempo para lograr la preñez. También tuvieron menos crías por camada, en consistencia con el menor número de cuerpos lúteos observados por histología ovárica. Esto también concuerda con estudios previos en los que se administró una DMAG durante 10 semanas, resultando en tasas de preñez más bajas y menos crías por camada en comparación con los animales control [224]. En conjunto, estos resultados sugieren que las alteraciones ováricas en los animales alimentados con DAG disminuyen el número de ovocitos ovulados y de crías por camada. Además, la ovulación ocurre después de períodos más largos, lo que conduce a una disminución de la fertilidad con un aumento en el tiempo para lograr la preñez. La administración de metformina a los ratones alimentados con la DAG disminuyó el tiempo para lograr la preñez y restauró el número de crías por camada a valores similares a los del grupo control. Estos resultados sugieren que metformina podría mejorar tanto el metabolismo sistémico como procesos locales del ovario, restaurando así la ovulación y

mejorando la fertilidad.

Para evaluar si la inducción de la ovulación puede superar la subfertilidad en ratones alimentados con DAG, superovulamos animales de cada grupo experimental, recolectamos sus ovocitos y realizamos una fecundación *in vitro* (FIV). Los ratones DAG ovularon menos ovocitos que los ratones control, independientemente del tratamiento con metformina. Este resultado refuerza el hecho de que la principal anomalía en nuestro modelo de DAG está relacionada con una disminución de la ovulación. Sin embargo, la calidad de los ovocitos ovulados no parece diferir entre los grupos, ya que estos son fertilizados y crecen de forma similar a los del grupo control. Estos resultados concuerdan con un trabajo de Hohos y col., quienes utilizaron un modelo de ratón con DMAG durante 10 semanas y encontraron que, después de la inducción de la ovulación, el número de ovocitos ovulados era menor en los animales alimentados con la DAG [225].

Se han propuesto muchos mecanismos para explicar las alteraciones en la ovulación, como una disminución en la expresión de diferentes genes relacionados con la ruptura del folículo o anomalías epigenéticas [226]. Nuestros resultados sugieren que, además de estos mecanismos, la DAG altera la angiogénesis ovárica, siendo la correcta regulación de los factores angiogénicos, un mecanismo esencial para una adecuada ovulación y formación de cuerpos lúteos [227].

Metformina no aumentó el número de ovocitos ovulados, sugiriendo que, al menos en nuestro modelo de ratones DAG, la estimulación con gonadotrofinas estaría enmascarando cualquier posible efecto de la metformina. Es ampliamente conocido que el tratamiento con metformina en mujeres con SOP aumenta las tasas de ovulación cuando se combina con citrato de clomifeno o gonadotrofinas, así como reduce el riesgo de síndrome de hiperestimulación ovárica y disminuye las tasas de aborto espontáneo [86]. En la obesidad y el síndrome metabólico, el efecto de metformina en la reproducción asistida no está bien establecido. Según nuestros

resultados, en un modelo de ratón con ingesta de una DAG, metformina fue útil para mejorar la fertilidad natural pero no mejoró los resultados reproductivos después de la inducción de la ovulación. Estudios adicionales, tanto en modelos animales como en mujeres, serían útiles para confirmar estos resultados.

En resumen, los ratones alimentados con DAG presentaron cambios en el ciclo estral, alteraciones en la esteroidogénesis, mayor tiempo para lograr la preñez y menos crías por camada. Encontramos que la angiogénesis ovárica desregulada y el aumento del daño al ADN en las células ováricas, podrían ser algunos de los mecanismos subyacentes a estos resultados. Como consecuencia, las tasas de ovulación fueron más bajas en los ratones alimentados con DAG, como se evidencia en la fertilidad natural y luego en la inducción de la ovulación con gonadotrofinas. El tratamiento con metformina logró mejorar la angiogénesis ovárica, lo que llevó a una mejor esteroidogénesis y ovulación, que a su vez disminuyó el tiempo para lograr la preñez y aumentó el tamaño de la camada. Sin embargo, metformina no aumentó el número de ovocitos recuperados después de la inducción con gonadotrofinas.

Concluimos que la desregulación de la angiogénesis ovárica es uno de los mecanismos que explicaría las alteraciones observadas en la funcionalidad ovárica y en la fertilidad; y que metformina podría revertir estas alteraciones ya que mejora la formación de vasos sanguíneos en el ovario.

Finalmente, estudiar los mecanismos por los cuales la DAG afecta la fertilidad femenina es esencial para desarrollar estrategias nuevas y más efectivas para el tratamiento en mujeres.



## Capítulo 2 B

Metformina en condiciones patológicas:

Animales expuestos *in utero* y durante  
la lactancia

## **METODOLOGÍA**

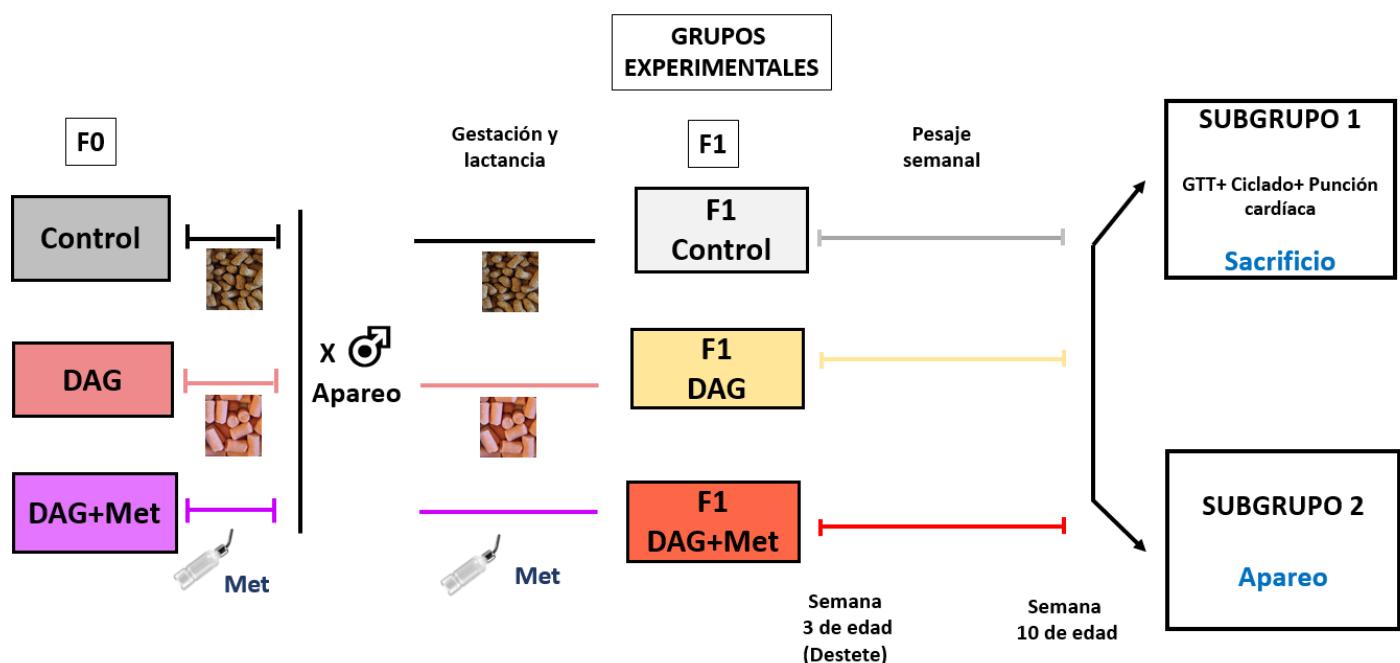
### **MODELO ANIMAL**

Como ya fue descripto en el Capítulo 2 A, las hembras C57BL/6 de 21 días de edad fueron separadas en tres grupos. Un grupo control, un grupo dieta alta en grasas (DAG) alimentado con DAG por 15 semanas y un grupo DAG tratado con metformina durante las últimas 4 semanas. A la semana 15, las hembras fueron apareadas con machos de fertilidad comprobada, sosteniendo el tratamiento durante toda la preñez y lactancia. Finalizada la misma, las crías fueron sexadas, pesadas y separadas de sus madres. Se conservó solo a las hembras, obteniendo tres grupos experimentales: **grupo F1 Control, grupo F1 DAG y grupo F1 DAG+Met**. Durante las 7 semanas siguientes, se permitió que las crías de los tres grupos crecieran con disponibilidad *ad libitum* de alimento y bebida, sin ningún tratamiento adicional realizado. Se registró el peso semanalmente y durante los últimos 14 días del experimento, se cicló de forma diaria a algunos animales de cada grupo para estudiar el ciclo estral. A las 10 semanas de vida, se realizó una curva de tolerancia a la glucosa y luego se separó a las hembras en dos subgrupos.

En el primero, se anestesió a los animales y se realizó una punción cardíaca para obtener sangre, previo al sacrificio. Una vez coagulada y centrifugada la misma, se obtuvo suero que fue conservado a -80° para su posterior utilización. Se extrajo y pesó el tejido adiposo mesentérico y gonadal, el hígado y los ovarios, los cuales fueron limpiados del tejido adherente subyacente y congelados o fijados en Bouin para realizar posteriormente técnicas de western blot y de inmunohistoquímica.

En el segundo subgrupo los animales fueron puestos en apareo con machos de fertilidad comprobada. Se estudió el tiempo que demoraron hasta lograr la preñez, tomando como día 1 aquel en el cual se visualizó el tapón vaginal, resultado de la cópula. La cantidad de crías obtenidas en la F2 y el peso de las mismas al nacer fue analizado.

La figura 31 muestra un diagrama esquemático del diseño experimental.



**Figura 31. Diagrama esquemático del diseño experimental.** DAG: Grupo dieta alta en grasas; DAG+Met: Grupo dieta alta en grasas+metformina; Met: metformina. GTT: prueba de tolerancia a la glucosa.

## TÉCNICAS

Las técnicas de ciclado, GTT, medición hormonal, inmunohistoquímica, western blot, recuento folicular y apareo fueron realizadas según lo descripto en el Capítulo 1 A.

El análisis estadístico fue realizado según lo descripto en el Capítulo 2 A.

## **RESULTADOS**

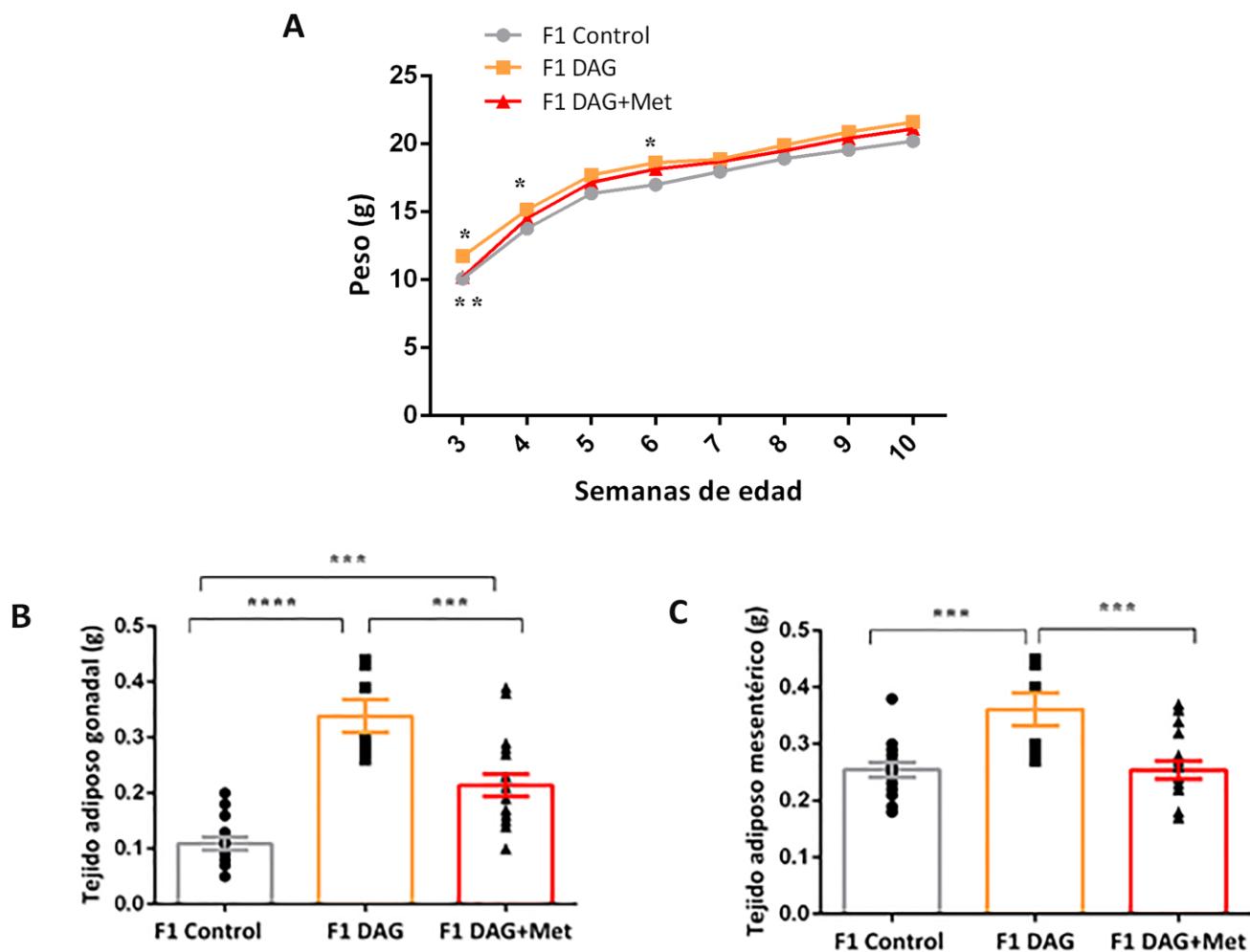
### **Efectos en parámetros metabólicos**

Para analizar posibles alteraciones metabólicas en las crías expuestas a la DAG y al tratamiento con metformina durante la gestación y lactancia, pesamos a los animales al momento de nacer (n=53-83), al finalizar la lactancia y luego una vez por semana durante siete semanas (n=11-12).

Como ya fue descripto en el Capítulo 2 A, las crías de los animales tratados no mostraron diferencias en el peso corporal al momento del nacimiento (Tabla 5) ( $p > 0,05$  entre grupos). Sin embargo, finalizada la lactancia (semana 3 de vida), el grupo F1 DAG presentó mayor peso corporal que el grupo F1 Control ( $p < 0,05$  vs F1 Control) y que el grupo F1 DAG+Met ( $p < 0,01$  vs F1 DAG+Met) (Figura 32 A). Luego de cuatro semanas de alimentación independiente, las diferencias de peso corporal entre los grupos se pierden ( $p > 0,05$  entre grupos) (Figura 32 A).

Luego de sacrificar a los animales analizamos el tejido adiposo de los mismos (n=7-17) y observamos que las crías de los animales alimentados con DAG presentaron mayor tejido adiposo gonadal y mesentérico ( $p < 0,001$  vs F1 Control) y que este aumento es revertido a partir del tratamiento de las madres con metformina ( $p < 0,001$  vs F1 DAG+Met) (Figura 32 B-C).

Por otro lado, no encontramos diferencias significativas en los valores de glucemia basal (n=5-6) ni en la curva de tolerancia a la glucosa entre grupos (n=6) (Tabla 6) ( $p > 0,05$  vs F1 Control), como así tampoco en el peso del hígado (F1 Control:  $0,99 \pm 0,03$  g; F1 DAG:  $0,91 \pm 0,03$  g; F1 DAG+Met:  $0,88 \pm 0,03$  g).



**Figura 32. Peso corporal y tejido adiposo en los grupos F1 Control, F1 DAG y F1 DAG+Met.** (A) Ganancia de peso corporal durante las siete semanas del experimento (B) Peso del tejido adiposo gonadal. (C) Peso del tejido adiposo mesentérico. Los datos se expresan como la media ± el error estándar de la media (SEM).

\*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p <0,001, \*\*\*\*p <0,0001.

**Tabla 6:** Parámetros metabólicos y hormonales de ratones F1 Control, F1 DAG y F1 DAG+Met a la semana 10 de edad.

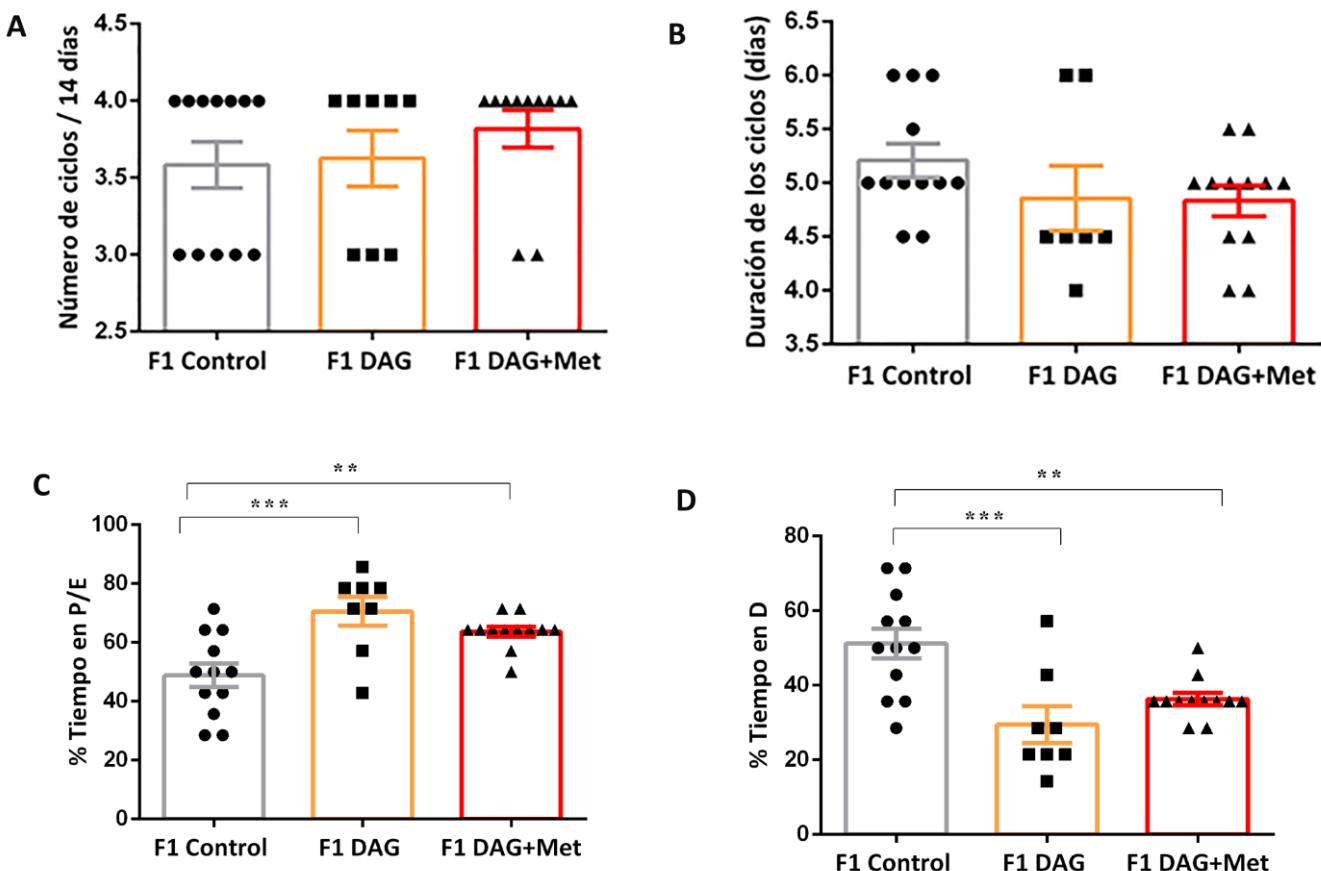
	F1 Control	F1 DAG	F1 DAG+Met
Glucemia (mg/dL)	141.1 ± 12.57	146.7 ± 8.38	140.4 ± 7.78
ABC (min*mg/dL)	20953 ± 1056	20265 ± 824.5	22210 ± 664.1
LH (ng/mL)	8.89 ± 0.86	8.37 ± 0.93	9.8 ± 2.04
FSH (ng/mL)	97.9 ± 18.05	155.5 ± 17.58	165.4 ± 24.31

Los datos están expresados como la media ± SEM. Para realizar comparaciones entre grupos se utilizó ANOVA, seguido de la prueba de Newman-Keuls. ABC: Area bajo la curva de glucosa. Diferencias significativas fueron definidas como  $p < 0,05$ .

### **Efectos en el ciclo estral y en la producción hormonal**

Para estudiar posibles alteraciones en el ciclo estral, analizamos la citología vaginal de los animales durante 14 días. Si bien no se observaron cambios en la cantidad de ciclos totales ( $n=8-12$ ) ni en la duración de los mismos ( $n=7-12$ ) ( $p > 0,05$  entre grupos) (Figura 33 A-B), el tiempo que pasaban los animales en cada una de las fases del ciclo ( $n=8-12$ ) fue diferente, observando que los animales expuestos tanto a DAG como a DAG y metformina pasaron más tiempo en los estadios proestro y estro (F1 DAG:  $p < 0,001$  vs F1 Control; F1 DAG+Met:  $p < 0,01$  vs F1 Control) y menos tiempo en los estadios diestro (F1 DAG:  $p < 0,001$  vs F1 Control; F1 DAG+Met:  $p < 0,01$  vs F1 Control), comparado a las crías de las hembras control (Figura 33 C-D) .

Si bien no se observaron diferencias significativas en las concentraciones séricas de FSH ( $n=6$ ) o de LH ( $n=6-7$ ) ( $p > 0,05$  entre grupos), se encontró una tendencia al aumento en las concentraciones de FSH en los dos grupos expuestos a la DAG (Tabla 6).

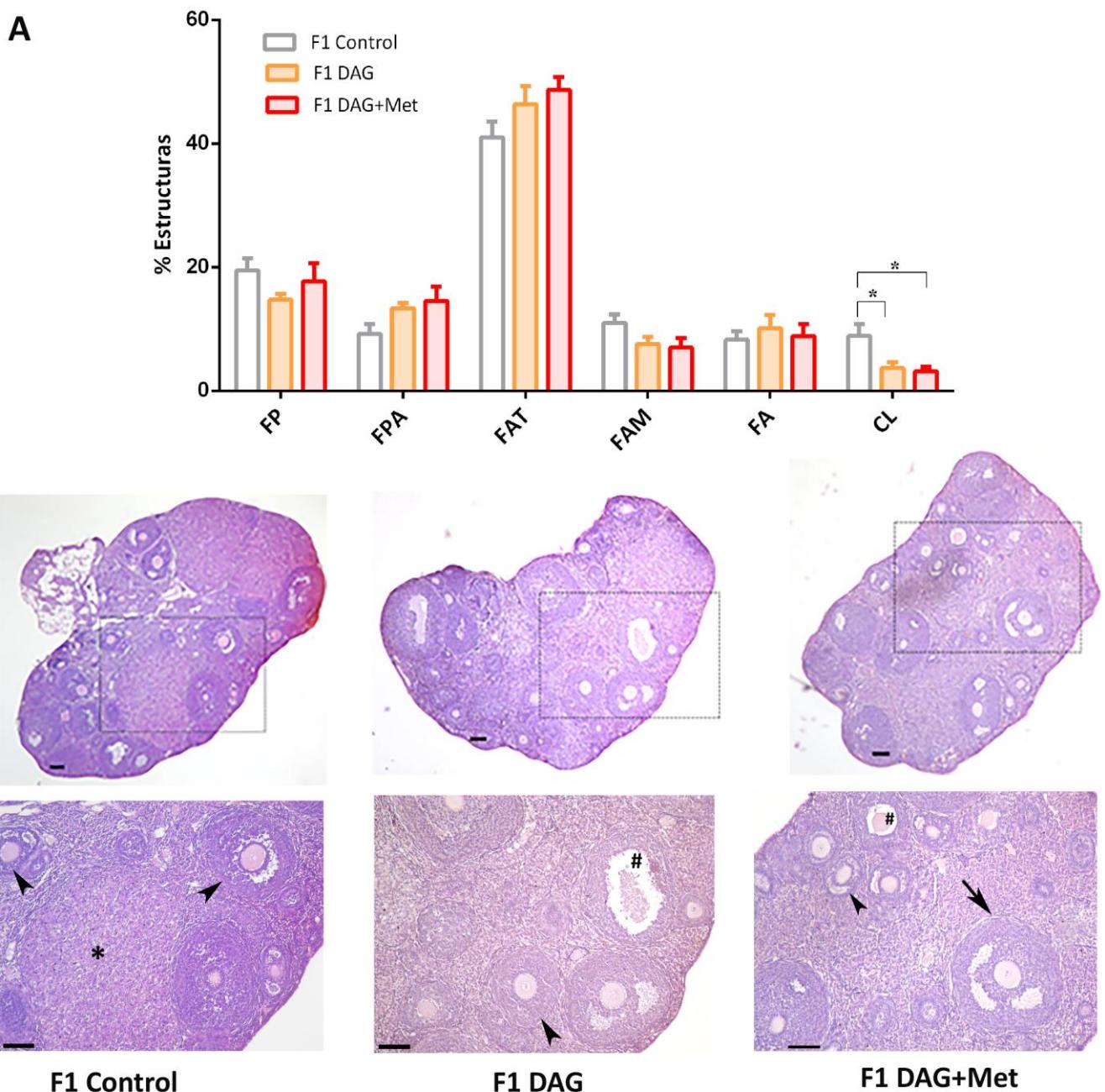


**Figura 33. Efecto en el ciclo estral de las crías de madres control o tratadas con DAG y con DAG+Met.**

(A) Número de ciclos en 14 días. (B) Duración de los ciclos. (C) % de tiempo transcurrido en las fases Proestro y Estro. (D) % de tiempo transcurrido en las fases Diestro I y Diestro II. Los datos se expresan como la media ± el error estándar de la media (SEM).

#### Efecto en el desarrollo folicular

Con el objetivo de estudiar posibles alteraciones en el desarrollo folicular, determinamos el porcentaje de estructuras en cada estadio en secciones histológicas teñidas con H&E ( $n=5-7$ ). No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de ninguna estructura folicular entre los grupos ( $p > 0,05$  entre grupos). Sin embargo, el porcentaje de cuerpos lúteos fue menor en los animales F1 DAG ( $p < 0,05$  vs F1 Control), sin observarse efectos por la exposición a metformina ( $p > 0,05$  vs F1 DAG) (Figura 34 A).

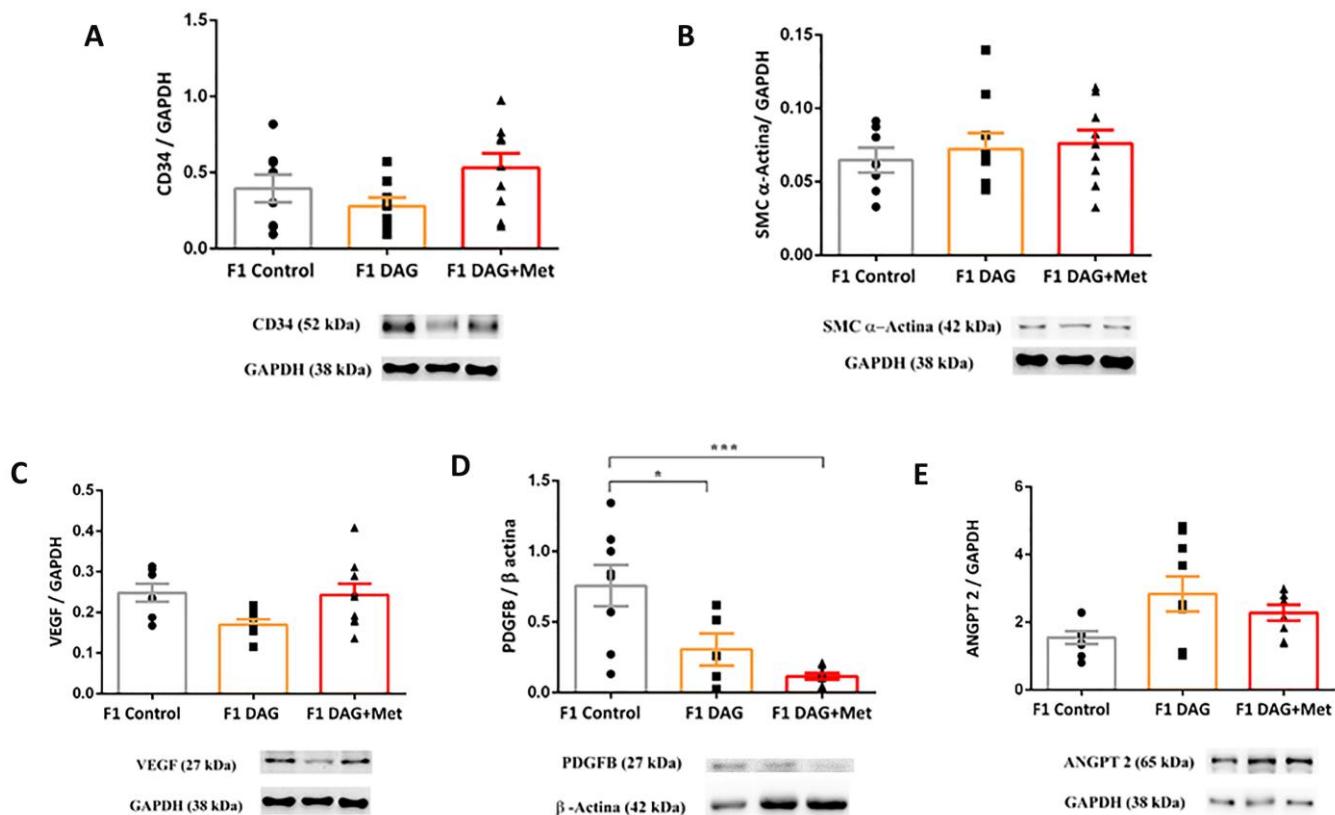


**Figura 34. Recuento folicular en los grupos F1 Control, F1 DAG y F1 DAG+Met.** (A) Porcentaje de cada estructura en secciones ováricas teñidas con H&E. FP: folículo primario. FPA: folículo preantral. FAT: folículo antral temprano. FAM: folículo antral maduro. FA: folículo atrésico. CL: Cuerpo lúteo. Las fotografías muestran imágenes representativas de los ovarios. Paneles superiores: barra de escala de 100 µm, aumento de 40X. Paneles inferiores: barra de escala de 100 µm, aumento de 100X; n=5-7. Las puntas de flecha indican folículos antrales tempranos; las flechas indican antrales maduros; los signos numerales indican folículos atrésicos; los asteriscos indican cuerpos lúteos. \*p < 0,05

## Efecto sobre la densidad y estabilidad vascular

Con el objetivo de evaluar el estado de la vasculatura en el ovario, medimos por western blot de ovario total al marcador de células endoteliales CD34 ( $n=8-9$ ) y al marcador de periendotelio vascular, alfa-actina de músculo liso ( $n=7-9$ ). No observamos diferencias significativas entre los grupos experimentales en ninguno de los dos parámetros ( $p > 0,05$  entre grupos) (Figura 35 A-B).

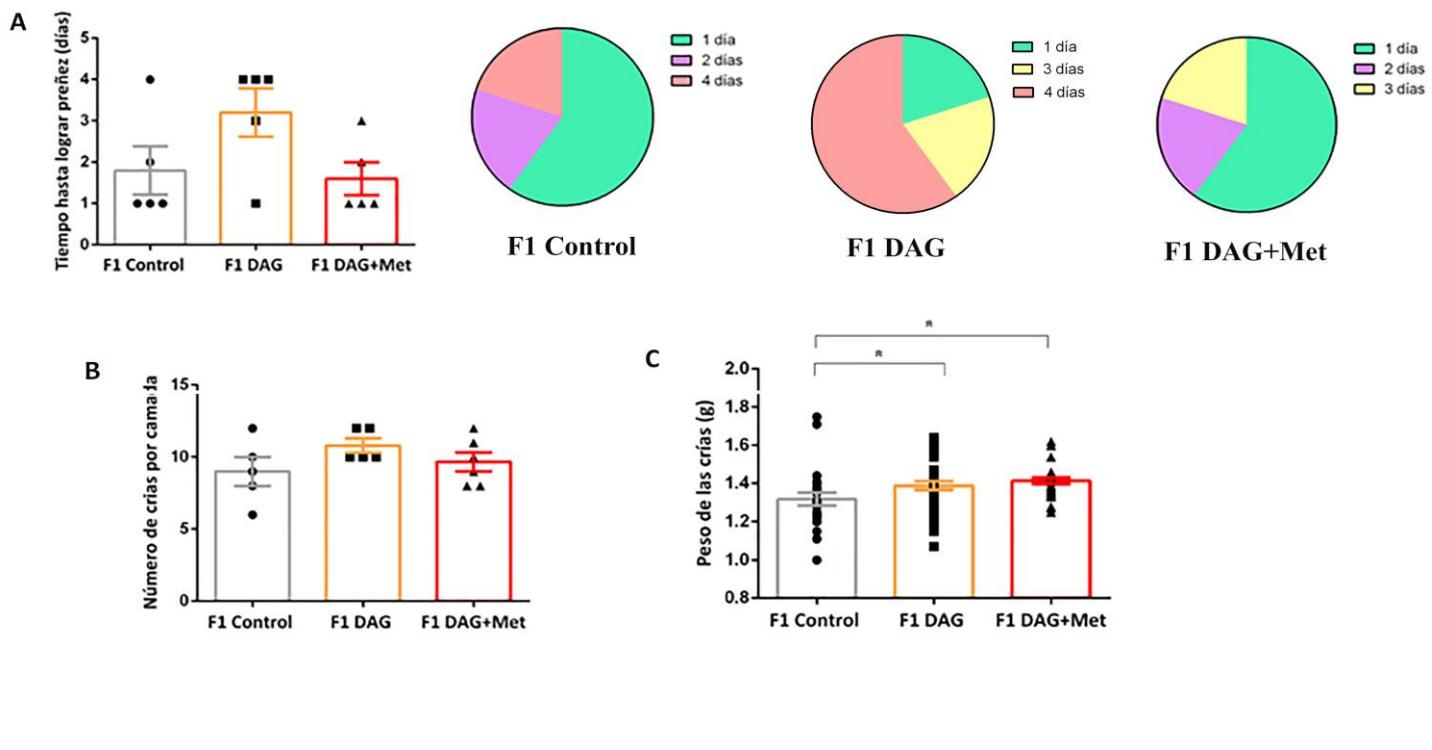
A continuación, estudiamos la expresión de los factores más importantes que regulan la angiogénesis. Si bien no encontramos diferencias significativas en VEGF ( $n=7-9$ ) (Figura 35 C) ni en angiopoyetina 2 (ANGPT2) ( $n=8-9$ ) ( $p > 0,05$  entre grupos) (Figura 35 E), el factor angiogénico PDGFB ( $n=5-8$ ) presentó una disminución significativa en los dos grupos expuestos a la DAG (F1 DAG:  $p < 0,05$  vs Control; F1 DAG+Met:  $p < 0,001$  vs Control) (Figura 35 D).



**Figura 35. Angiogénesis ovárica en los grupos F1 Control, F1 DAG y F1 DAG+Met.** (A) Análisis densitométrico del marcador de células endoteliales CD34. (B) Análisis densitométrico del marcador de células periendoeliales alfa-actina de músculo liso. (C) Análisis densitométrico de VEGF. (D) Análisis densitométrico de PDGFB. (E) Análisis densitométrico de ANGPT2. La densidad de cada banda se normalizó a las bandas de GAPDH o  $\beta$ -actina. Los paneles inferiores muestran bandas representativas de cada proteína analizada. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

### **Efecto en parámetros de fertilidad**

Para evaluar si el rendimiento reproductivo de los ratones se vio afectado por la exposición a la DAG y al tratamiento con metformina, apareamos a las crías con machos C57BL/6 de fertilidad comprobada. Observamos que el grupo F1 DAG mostró una tendencia a demorar más tiempo en lograr la preñez que los animales de los otros dos grupos experimentales, sin embargo, no hay diferencias significativas entre los grupos en este parámetro ( $n=5$ ) ( $p > 0,05$  entre grupos) (Figura 36 A). Tampoco se encontraron diferencias significativas en la cantidad de crías obtenidas por camada ( $n=5$ ) ( $p > 0,05$  vs entre grupos) (Figura 36 B), pero sí en el peso de las mismas al nacer ( $n=28-41$ ), que fue significativamente mayor en las crías del grupo F1 DAG, así como también en las crías del grupo F1 DAG+Met ( $p < 0,05$  vs F1 Control) (Figura 36 C).



**Figura 36. Efectos en la fertilidad natural.** (A) Tiempo hasta lograr preñez. (B) Número de crías por camada.

(C) Peso de las crías al momento del nacimiento. Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). \*p < 0,05.

## **DISCUSIÓN**

El consumo de una dieta alta en grasas durante la gestación y la lactancia puede tener efectos significativos en el desarrollo y la salud de la descendencia, tanto a corto como a largo plazo. La nutrición materna juega un papel crítico en el desarrollo fetal, y un exceso de grasas puede influir negativamente en diferentes aspectos del crecimiento y la salud de la progenie. Entre ellos, se observa un mayor riesgo de desarrollar obesidad y síndrome metabólico [228–230], alteraciones en el desarrollo neurológico [231–233] y en el sistema inmunológico [234,235], impacto en la microbiota intestinal [236], mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares [237,238] y efectos en la salud hepática [239–241]. Sin embargo, los efectos en la salud reproductiva de la descendencia están poco estudiados. En este trabajo, encontramos que las crías de ratones expuestos a una DAG durante la gestación y la lactancia presentaron no solo alteraciones metabólicas en la adultez, sino también alteraciones en parámetros reproductivos, entre ellos, el ciclo estral, la ovulación y la angiogénesis ovárica. Observamos también una tendencia a demorar más tiempo en lograr la preñez y consecuencias metabólicas incluso en una segunda generación. La exposición a metformina además de la dieta, mejoró algunas de las alteraciones observadas en la descendencia, pero no todas.

Para comenzar con el estudio, analizamos parámetros metabólicos en la descendencia de madres alimentadas con dieta control, DAG y en aquellas tratadas con metformina además de la DAG. Si bien los animales no presentaron diferencias de peso al momento del nacimiento, a las 3 semanas de edad, es decir al finalizar la lactancia, los ratones expuestos a DAG mostraron mayor peso corporal que la descendencia de ratones control y la descendencia de los tratados con la droga. Esta diferencia de peso que se observa luego de la lactancia puede deberse tanto a la diferencia en el número de crías en las camadas, ya que el número de crías por camada de madres DAG fue menor respecto a los otros dos grupos; como a alteraciones en el contenido de la leche materna. Estudios

previos han demostrado que la leche materna proveniente de mujeres con sobrepeso u obesidad presenta más grasas y contenido calórico que aquella proveniente de madres normopeso [242], además de observarse alteraciones en el contenido de ácidos grasos y lípidos según los hábitos alimenticios de las madres [243,244]. En nuestro modelo observamos que cuando las madres son tratadas con metformina, el aumento de peso en la descendencia luego de la lactancia no sucede. Las concentraciones de metformina en leche materna son bajas [245], por lo que este efecto probablemente se deba a una recomposición del contenido de la leche, más que a una consecuencia directa de metformina sobre la progenie. En concordancia con nuestros resultados, trabajos anteriores han demostrado que las crías de madres alimentadas con DAG durante la lactancia son más pesadas en el día post-natal 16, al encontrarse expuestas a una leche materna con mayor contenido lipídico (mayor cantidad de ácidos grasos de cadena larga omega-6 y menor cantidad de omega-3), alteración que es revertida al tratar con metformina a las madres [246]. Por otro lado, las madres tratadas con DAG presentaron mayores concentraciones séricas de glucosa, por lo que la leche consumida por las crías durante la lactancia podría también presentar un elevado contenido de azúcares. Sin embargo, si bien en este trabajo no analizamos el contenido de glucosa en la leche, trabajos previos han demostrado que la leche materna de mujeres con diabetes tipo 1 posee concentraciones de glucosa similares a la leche de mujeres control [247], lo que refuerza la hipótesis del mayor contenido lipídico.

Transcurridas las primeras semanas de alimentación independiente de los animales, las diferencias de peso corporal se pierden, sin embargo, los animales expuestos a la DAG presentan mayor tejido adiposo gonadal y visceral en la adultez. Es posible que las diferencias en la cantidad de tejido adiposo analizado no sean lo suficientemente grandes como para verse reflejadas en el peso corporal total de los animales, el cual se encuentra además determinado por la cantidad de tejido adiposo subcutáneo y el contenido no graso de los restantes tejidos y órganos.

El aumento del tejido adiposo en la descendencia de madres tratadas con DAG, fue previamente reportado en modelos experimentales similares [248], observándose además un aumento de la ingesta calórica de los animales [249], y diferencias en la expresión génica en el tejido adiposo blanco y marrón de la descendencia expuesta [250]. En nuestro estudio, el tratamiento con metformina a las madres, por su parte, logró revertir el aumento del tejido adiposo en las crías. Este efecto de la exposición a la droga durante la gestación y lactancia es un efecto metabólico benéfico, ya que el exceso de tejido adiposo es un factor clave para el desarrollo de patologías, tales como la diabetes, síndrome metabólico, hipertensión y enfermedades cardiovasculares, entre otras. La bibliografía existente en relación a la cantidad de tejido adiposo en la descendencia de madres tratadas con la droga es controversial. Josca M Schoonejans y col. reportaron que, en un modelo murino, la exposición a metformina durante el desarrollo aumentó el riesgo de padecer patologías metabólicas en las crías de madres obesas, observando distinta susceptibilidad dependiendo de la edad y del sexo de la descendencia [251,252]. Una posible explicación de las diferencias en el impacto de la metformina en las crías según el sexo y la edad podría radicar en las acciones anti-inflamatorias de los estrógenos [253], los cuales son menores en los machos y a su vez disminuyen a edades avanzadas. En humanos, como ya se discutió en el Capítulo 1 B de esta tesis, los estudios a largo plazo son escasos, y hasta ahora no hacen distinción por sexo, por lo que sería conveniente profundizar la investigación en este área. En nuestro trabajo, a pesar de que la glucemia de las madres alimentadas con DAG se encuentra elevada, no observamos la diferencia de peso al nacer descripta en bebés de madres con DT2 [101]. Nuestro modelo experimental, por lo tanto, se asemeja más a lo observado en mujeres con sobrepeso u obesidad [142,254]. Cabe resaltar que aún no existen estudios en adultos que fueron expuestos a metformina *in utero*. En nuestro trabajo encontramos que, en ratones adultos, la metformina es capaz de mejorar la redistribución del tejido adiposo ocasionada por la exposición a DAG de la madre en la preñez y lactancia. Esto sería un efecto

beneficioso del tratamiento con metformina a las madres en el embarazo a largo plazo.

Otro parámetro metabólico analizado fue la concentración sérica de glucosa y su metabolización, en donde, al igual que en otros trabajos similares, no se observaron diferencias significativas entre los grupos [252]. Esto, en principio, indicaría una alteración metabólica poco severa en la descendencia, acotada al contenido graso, que no fue suficiente para alterar la regulación de la glucosa. En nuestro modelo, sin embargo, no estudiamos a la descendencia en la adultez tardía, momento en el que se presenta la mayor tendencia a desarrollar alteraciones en el metabolismo de la glucosa. Por lo tanto, consideramos que sería interesante estudiar este parámetro a esa edad, para ver si la exposición a la dieta durante el desarrollo aumenta o no el riesgo de presentar un estado de hiperglucemia o de resistencia a la insulina en la adultez tardía. También sería interesante estudiar el metabolismo lipídico en estos animales.

A continuación, para comenzar a caracterizar el estado reproductivo de los animales, estudiamos el ciclo estral. Si bien los animales no presentaron alteraciones en la cantidad de ciclos ni en su duración, aquellos expuestos a la DAG durante el desarrollo pasaron más tiempo en los estadios proestro y estro y menos tiempo en los estadios diestro, sin observarse diferencias por la exposición a metformina. Trabajos previos realizados en ratas demostraron que los animales expuestos durante la gestación y la lactancia a una dieta con 45 % de contenido graso presentaron un inicio precoz de la pubertad y ciclos estrales irregulares, con estros más prolongados y persistentes. Los autores sugieren que esto puede estar relacionado con un envejecimiento ovárico temprano, en respuesta a un ambiente de desarrollo nutricionalmente excesivo [255]. En el Capítulo 2 A de este trabajo de tesis, caracterizamos el ciclo estral de animales directamente tratados con la DAG y con metformina, y observamos que contrariamente a lo que vemos en la progenie, los animales pasaron menos tiempo en los estadios ovulatorios proestro y estro y más tiempo en los anovulatorios diestro. Estas diferencias sugieren que las consecuencias de la DAG en el ovario son distintas si la

misma impacta cuando el órgano se encuentra en formación o durante la etapa reproductiva.

A continuación, para evaluar si las alteraciones en el ciclo estral se relacionan con desbalances hormonales, estudiamos las concentraciones séricas de FSH y LH. No observamos diferencias significativas entre los grupos, pero si una tendencia al aumento de las concentraciones de FSH en los animales expuestos a DAG, con o sin exposición a metformina. Este resultado concuerda con trabajos previos en rata, en donde se observan concentraciones elevadas de FSH en la progenie expuesta a DAG [198]. En este trabajo, los autores especulan que, a pesar del aumento en las concentraciones séricas de esta hormona, los animales expuestos a la DAG poseen una disminución de la respuesta a la FSH que provoca deterioro folicular.

Para que el análisis del estado del eje hipotalámico-hipofisario-gonadal se encuentre completo, resultaría conveniente estudiar las concentraciones séricas de estradiol y progesterona. De esta forma, se podría evaluar la respuesta del ovario a las gonadotrofinas, y por ende su funcionalidad. Analizamos, luego, en nuestro modelo, los distintos estadios foliculares a partir de la realización de un recuento folicular. No observamos diferencias significativas en ninguno de los estadios de desarrollo, excepto en la cantidad de cuerpos lúteos que se encontró disminuida, independientemente del tratamiento con metformina. Este resultado, condice con lo que observamos en el Capítulo 2 A de esta tesis, en donde los animales tratados directamente con la DAG, presentaron menor cantidad de cuerpos lúteos; aunque en este caso, el tratamiento directo con la droga logró revertir los efectos nocivos de la dieta. Trabajos previos sugieren que la administración de DAG durante la gestación puede afectar la reserva ovárica y el desarrollo folicular de la progenie, y que estos efectos no logran ser revertidos por el tipo de alimentación administrada a la descendencia luego del destete; además de reportar disfunción mitocondrial en los ovarios de las crías [256]. Otros autores reportaron cambios en el estado redox [257] y mayor apoptosis en el ovario de animales expuestos a la dieta, que compromete el desarrollo folicular y aumenta la atresia

[198]. La mayoría de estos trabajos, sin embargo, fueron realizados con dietas obesogénicas con un contenido calórico mucho mayor que la dieta utilizada en este trabajo de tesis, o utilizaron otras especies como modelo experimental. Ying Cheong, M.D y col. [258], en cambio, al igual que en este trabajo, alimentaron a ratones con una dieta con 45% de calorías provenientes de la grasa durante 6 semanas antes del apareo y luego durante la preñez y lactancia. Evaluaron los ovarios de las crías 15 semanas después del destete y observaron menor número de folículos primordiales, antrales y preovulatorios en los animales expuestos a la DAG. Consideramos que las diferencias con los resultados de Ying Cheong, M.D y col. pueden relacionarse tanto con las diferencias en la cantidad de semanas previas al apareo que fue administrada la DAG a las madres, así como también a la diferencia en la edad de las crías al momento de estudiar sus ovarios, los cuales, en ese trabajo, se encontraban más envejecidos. Teniendo en cuenta que solo observamos diferencias en la cantidad de cuerpos lúteos, y no en el desarrollo de los folículos en el ovario, podemos hipotetizar que la exposición a la DAG podría estar alterando la ovulación, lo que concuerda con la tendencia a demorar más tiempo en lograr la preñez en los animales expuestos a la dieta durante el desarrollo, al analizar la fertilidad natural. Como vimos en el Capítulo 2 A, en los animales que recibieron DAG, metformina revirtió la disminución de los cuerpos lúteos; sin embargo, en la descendencia, la exposición a la droga no fue suficiente para mejorar la alteración en la ovulación. Esto demuestra que el tratamiento de las madres con la droga, no es suficiente para revertir la posible programación fetal provocada por la DAG.

Como mencionamos en los capítulos anteriores de este trabajo de tesis, la presencia de una vasculatura estable y funcional es fundamental para el correcto desarrollo folicular y la ovulación. A partir del análisis de la vasculatura ovárica de la descendencia, pudimos observar que, si bien la cantidad de vasos no presenta cambios, las crías de los animales tratados con DAG, independientemente de la exposición a metformina, presentan una menor expresión del factor

angiogénico PDGFB. La consecuencia de una menor expresión de este factor, es una disminución en el reclutamiento y proliferación de las células periendoteliales, encargadas de estabilizar y volver funcional al vaso en formación, por lo que podría pensarse que los vasos sanguíneos ováricos de los animales expuestos a la DAG son más inestables que los de los animales no expuestos. Sin embargo, al analizar el marcador de células periendoteliales  $\alpha$ -actina por western blot, no observamos diferencias significativas entre grupos. Sería interesante realizar estudios de inmunohistoquímica, ya que en el western blot, las diferencias podrían no observarse por estar enmascaradas al utilizar el ovario entero para el estudio. Los trabajos que analizan la vasculatura de la descendencia de animales expuestos *in utero* a condiciones metabólicamente desfavorables son escasos. Hayan Kwon y col. reportaron que la hiperglucemia materna como consecuencia del desarrollo de DMG, provocó una disfunción angiogénica en las células progenitoras endoteliales fetales, alterando la expresión génica y provocando también cambios epigenéticos. Como consecuencia, las crías presentan una mayor susceptibilidad a enfermedades cardiovasculares [259]. Por otro lado, en las placetas de animales obesos, se observó también una disminución de la expresión de genes relacionados con la angiogénesis. Esto conlleva a una menor vascularización placentaria, capaz de afectar el desarrollo fetal [260]. Teniendo en cuenta estos antecedentes, profundizar el estudio de las consecuencias en la vasculatura de la descendencia, resulta fundamental para analizar posibles alteraciones en la salud reproductiva de los animales expuestos a condiciones metabólicas desfavorables durante el desarrollo.

En cuanto a la fertilidad natural de los animales, si bien los animales expuestos a la DAG durante el desarrollo tienden a demorar más tiempo en lograr la preñez, la cantidad de crías obtenidas por camada no difiere por la exposición a la dieta ni al tratamiento con metformina. Sin embargo, independientemente de la exposición a metformina, estos animales presentaron una descendencia con mayor peso corporal al momento del nacimiento. Consideramos que este efecto podría estar

respondiendo al fenómeno de herencia transgeneracional, dado que las células germinales que dan origen a la segunda generación (F2), estuvieron expuestas al tratamiento recibido por la F0. Otros trabajos demostraron que el tratamiento materno con DAG o con dietas con bajo contenido proteico, predispone a la primera generación a desarrollar obesidad y síndrome metabólico, y que un fenotipo similar puede ser transmitido a la segunda e incluso tercera generación, a pesar de la normal nutrición de la F1 durante la gestación [261,262].

Los mecanismos mediante los cuales sucede este tipo de herencia no responden a modificaciones genéticas, sino a posibles alteraciones epigenéticas tales como metilaciones en el DNA, modificaciones en las histonas, cambios en el empaquetamiento de la cromatina o por la regulación génica a través de RNA no codificantes. Se necesitan más estudios para dilucidar cuáles de estos mecanismos son los responsables de los efectos transgeneracionales observados en este trabajo.

En resumen, en este capítulo pudimos caracterizar los efectos tanto metabólicos como reproductivos de la exposición durante el desarrollo y lactancia a una DAG y al tratamiento con metformina. Observamos que las crías hembra expuestas a DAG presentaron mayor peso corporal al momento del destete y mayor tejido adiposo en su adultez temprana, siendo ambas alteraciones revertidas por el tratamiento materno con metformina. En cuanto a los efectos reproductivos, la DAG provocó en la descendencia cambios en el ciclo estral, en la ovulación y en el peso corporal de la segunda generación de animales expuestos. Ninguna de estas alteraciones reproductivas logró ser revertida a partir del tratamiento materno con la droga.

Es interesante remarcar que metformina posee acciones directas en el ovario y, además, como demostramos en el capítulo 2A de esta tesis, es capaz de revertir las alteraciones reproductivas en hembras que reciben DAG en su adultez. Sin embargo, no es capaz de prevenir la programación fetal y las alteraciones ováricas que ocurren en la descendencia que se desarrolla en un ambiente intrauterino alterado por la ingesta de DAG de las madres. Es por esto que alentamos a la comunidad

médica y científica a concientizar a las mujeres embarazadas sobre la importancia de mantener una dieta sana y un estilo de vida adecuado, ya que una mala alimentación puede repercutir no solo en sí mismas, sino también en su descendencia directa al nacer y en la adultez, e incluso en una segunda generación.



## CONCLUSIÓN FINAL

*En este trabajo de tesis estudiamos los efectos reproductivos de metformina en un modelo de ratón hembra sin patología y en un modelo de ratón hembra con ingesta de una dieta alta en grasas. Analizamos a su vez si metformina podría tener efectos en la fertilidad de la descendencia femenina de madres tratadas con la droga durante la preñez y la lactancia. A partir de los resultados obtenidos concluimos que los efectos del hipoglucemiantre metformina exceden aquellos relacionados al metabolismo de la glucosa.*

*Pudimos comprobar que metformina actúa sobre el ovario y la fertilidad femenina, tanto en condiciones fisiológicas, sin patología metabólica asociada, como en condiciones patológicas, donde el metabolismo se encuentra alterado. Es además capaz de mitigar las numerosas consecuencias negativas de la ingesta de una dieta alta en grasas sobre el ovario y la fertilidad. Más aún, metformina no solo afecta al ovario de hembras tratadas directamente, sino también al de aquellas expuestas a la droga de forma indirecta, durante su desarrollo in utero y durante la lactancia. En estas crías observamos efectos reproductivos en la adultez e incluso encontramos que su progenie, es decir, la segunda generación de madres tratadas con la droga, tiene mayor peso al nacer. Es por ello que concluimos que la metformina estaría actuando sobre el ovario y las gametas en formación durante el desarrollo intrauterino de las crías.*

*Todos los efectos que demostramos en este estudio nos permiten proponer un reposicionamiento de metformina como un posible candidato a utilizar en patologías reproductivas que cursen o no asociadas a alteraciones en los niveles séricos de glucosa. Con respecto a su administración durante el embarazo, se necesitan más estudios que aumenten la evidencia de los efectos a largo plazo en la progenie, tanto metabólicos como también reproductivos, para recomendar el uso de esta droga a mujeres embarazadas en forma segura.*

## **BIBLIOGRAFÍA**

- [1] C. Thibault, M. Levasseur, Reproduction in mammals and man., in: 1993. <https://www.semanticscholar.org/paper/Reproduction-in-mammals-and-man.-Thibault-Levasseur/81fdbbe9ee2fcc0ad70fe5daf5d3280a18f7858c8> (accessed November 11, 2024).
- [2] E.A. McGee, A.J. Hsueh, Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles, *Endocr Rev* 21 (2000) 200–214. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.2.0394>.
- [3] B.A. Oxberry, G.S. Greenwald, An autoradiographic study of the binding of  $^{125}\text{I}$ -labeled follicle-stimulating hormone, human chorionic gonadotropin and prolactin to the hamster ovary throughout the estrous cycle, *Biol Reprod* 27 (1982) 505–516. <https://doi.org/10.1095/biolreprod27.2.505>.
- [4] T.R. Kumar, Y. Wang, N. Lu, M.M. Matzuk, Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility, *Nat Genet* 15 (1997) 201–204. <https://doi.org/10.1038/ng0297-201>.
- [5] A. Gougeon, J. Testart, Germinal vesicle breakdown in oocytes of human atretic follicles during the menstrual cycle, *J Reprod Fertil* 78 (1986) 389–401. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0780389>.
- [6] A.J. Zeleznik, H.M. Schuler, L.E. Reichert, Gonadotropin-binding sites in the rhesus monkey ovary: role of the vasculature in the selective distribution of human chorionic gonadotropin to the preovulatory follicle, *Endocrinology* 109 (1981) 356–362. <https://doi.org/10.1210/endo-109-2-356>.
- [7] A.J. Zeleznik, A.R. Midgley, L.E. Reichert, Granulosa cell maturation in the rat: increased binding of human chorionic gonadotropin following treatment with follicle-stimulating hormone *in vivo*, *Endocrinology* 95 (1974) 818–825. <https://doi.org/10.1210/endo-95-3-818>.
- [8] X.N. Wang, G.S. Greenwald, Synergistic effects of steroids with FSH on folliculogenesis,

steroidogenesis and FSH- and hCG-receptors in hypophysectomized mice, J Reprod Fertil 99 (1993) 403–413. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0990403>.

[9] A.M. Vitale, O.M. Gonzalez, F. Parborell, G. Irusta, S. Campo, M. Tesone, Inhibin a increases apoptosis in early ovarian antral follicles of diethylstilbestrol-treated rats, Biol Reprod 67 (2002) 1989–1995. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.003673>.

[10] A. Foghi, K.J. Teerds, H. van der Donk, N.C. Moore, J. Dorrington, Induction of apoptosis in thecal/interstitial cells: action of transforming growth factor (TGF) alpha plus TGF beta on bcl-2 and interleukin-1 beta-converting enzyme, J Endocrinol 157 (1998) 489–494. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1570489>.

[11] J.L. Tilly, K.I. Kowalski, A.L. Johnson, A.J. Hsueh, Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression, Endocrinology 129 (1991) 2799–2801. <https://doi.org/10.1210/endo-129-5-2799>.

[12] H.G. Pedersen, E.D. Watson, E.E. Telfer, Analysis of atresia in equine follicles using histology, fresh granulosa cell morphology and detection of DNA fragmentation, Reproduction 125 (2003) 417–423.

[13] T.M. Plant, A.J. Zeleznik, Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, Academic Press, 2014.

[14] M.G. Caron, S. Goldstein, K. Savard, J.M. Marsh, Protein kinase stimulation of a reconstituted cholesterol side chain cleavage enzyme system in the bovine corpus luteum, J Biol Chem 250 (1975) 5137–5143.

[15] T.M. Hazzard, F. Xu, R.L. Stouffer, Injection of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 into the preovulatory follicle disrupts ovulation and subsequent luteal function in rhesus monkeys, Biol Reprod 67 (2002) 1305–1312. <https://doi.org/10.1095/biolreprod67.4.1305>.

- [16] M.C. Peluffo, L. Bussmann, R.L. Stouffer, M. Tesone, Expression of caspase-2, -3, -8 and -9 proteins and enzyme activity in the corpus luteum of the rat at different stages during the natural estrous cycle, *Reproduction* 132 (2006) 465–475. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00910>.
- [17] C. Stocco, C. Telleria, G. Gibori, The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression, *Endocr Rev* 28 (2007) 117–149. <https://doi.org/10.1210/er.2006-0022>.
- [18] S.F. Carambula, T. Matikainen, M.P. Lynch, R.A. Flavell, P.B.D. Gonçalves, J.L. Tilly, B.R. Rueda, Caspase-3 is a pivotal mediator of apoptosis during regression of the ovarian corpus luteum, *Endocrinology* 143 (2002) 1495–1501. <https://doi.org/10.1210/endo.143.4.8726>.
- [19] J.A. Owen, Physiology of the menstrual cycle, *Am J Clin Nutr* 28 (1975) 333–338. <https://doi.org/10.1093/ajcn/28.4.333>.
- [20] M.C. Cora, L. Kooistra, G. Travlos, Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears, *Toxicol Pathol* 43 (2015) 776–793. <https://doi.org/10.1177/0192623315570339>.
- [21] A.C. McLean, N. Valenzuela, S. Fai, S.A.L. Bennett, Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification, *J Vis Exp* (2012) e4389. <https://doi.org/10.3791/4389>.
- [22] J.R. Starrett, S.M. Moenter, Hypothalamic kisspeptin neurons as potential mediators of estradiol negative and positive feedback, *Peptides* 163 (2023) 170963. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2023.170963>.
- [23] G.R. Cunha, A. Sinclair, W.A. Ricke, S.J. Robboy, M. Cao, L.S. Baskin, Reproductive tract biology: Of mice and men, *Differentiation* 110 (2019) 49–63. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2019.07.004>.
- [24] W. Risau, I. Flamme, Vasculogenesis, *Annu Rev Cell Dev Biol* 11 (1995) 73–91.

<https://doi.org/10.1146/annurev.cb.11.110195.000445>.

[25] W. Risau, Mechanisms of angiogenesis, *Nature* 386 (1997) 671–674.

<https://doi.org/10.1038/386671a0>.

[26] G.D. Yancopoulos, S. Davis, N.W. Gale, J.S. Rudge, S.J. Wiegand, J. Holash, Vascular-specific growth factors and blood vessel formation, *Nature* 407 (2000) 242–248.

<https://doi.org/10.1038/35025215>.

[27] H. Gerhardt, C. Betsholtz, Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis, *Cell Tissue Res* 314 (2003) 15–23. <https://doi.org/10.1007/s00441-003-0745-x>.

[28] M. Klagsbrun, P.A. D'Amore, Vascular endothelial growth factor and its receptors, *Cytokine Growth Factor Rev* 7 (1996) 259–270. [https://doi.org/10.1016/s1359-6101\(96\)00027-5](https://doi.org/10.1016/s1359-6101(96)00027-5).

[29] J. Folkman, M. Klagsbrun, Angiogenic factors, *Science* 235 (1987) 442–447. <https://doi.org/10.1126/science.2432664>.

[30] R. Lugano, M. Ramachandran, A. Dimberg, Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities, *Cell Mol Life Sci* 77 (2020) 1745–1770. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03351-7>.

[31] R.L. Stouffer, J.C. Martínez-Chequer, T.A. Molskness, F. Xu, T.M. Hazzard, Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary, *Arch Med Res* 32 (2001) 567–575. [https://doi.org/10.1016/s0188-4409\(01\)00323-x](https://doi.org/10.1016/s0188-4409(01)00323-x).

[32] L.P. Reynolds, A.T. Grazul-Bilska, S.D. Killilea, D.A. Redmer, Mitogenic factors of corpora lutea, *Prog Growth Factor Res* 5 (1994) 159–175. [https://doi.org/10.1016/0955-2235\(94\)90003-5](https://doi.org/10.1016/0955-2235(94)90003-5).

[33] D.A. Redmer, V. Doraiswamy, B.J. Bortnem, K. Fisher, A. Jablonka-Shariff, A.T. Grazul-Bilska, L.P. Reynolds, Evidence for a role of capillary pericytes in vascular growth of the

developing ovine corpus luteum, Biol Reprod 65 (2001) 879–889.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod65.3.879>.

[34] G. Allt, J.G. Lawrenson, Pericytes: cell biology and pathology, Cells Tissues Organs 169 (2001) 1–11. <https://doi.org/10.1159/000047855>.

[35] A. Armulik, G. Genové, C. Betsholtz, Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises, Dev Cell 21 (2011) 193–215. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.07.001>.

[36] A. Sato, S. Miyoshi, Morphometric study of the microvasculature of the main excretory duct subepithelia of the rat parotid, submandibular and sublingual salivary glands, Anat Rec 226 (1990) 288–294. <https://doi.org/10.1002/ar.1092260304>.

[37] S. Azzi, J.K. Hebda, J. Gavard, Vascular permeability and drug delivery in cancers, Front Oncol 3 (2013) 211. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00211>.

[38] Y. Dor, R. Porat, E. Keshet, Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis, Am J Physiol Cell Physiol 280 (2001) C1367-1374. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.280.6.C1367>.

[39] E.Y. Soh, S.A. Sobhi, M.G. Wong, Y.G. Meng, A.E. Siperstein, O.H. Clark, Q.Y. Duh, Thyroid-stimulating hormone promotes the secretion of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cell lines, Surgery 120 (1996) 944–947. [https://doi.org/10.1016/s0039-6060\(96\)80038-9](https://doi.org/10.1016/s0039-6060(96)80038-9).

[40] J.L. Shifren, S. Mesiano, R.N. Taylor, N. Ferrara, R.B. Jaffe, Corticotropin regulates vascular endothelial growth factor expression in human fetal adrenal cortical cells, J Clin Endocrinol Metab 83 (1998) 1342–1347. <https://doi.org/10.1210/jcem.83.4.4730>.

[41] L.K. Christenson, R.L. Stouffer, Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone/chorionic gonadotropin stimulation of vascular endothelial growth factor production

by macaque granulosa cells from pre- and periovulatory follicles, J Clin Endocrinol Metab 82 (1997) 2135–2142. <https://doi.org/10.1210/jcem.82.7.4169>.

[42] R.J. Stewart, D. Panigrahy, E. Flynn, J. Folkman, Vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis are regulated by androgens in hormone responsive human prostate carcinoma: evidence for androgen dependent destabilization of vascular endothelial growth factor transcripts, J Urol 165 (2001) 688–693. <https://doi.org/10.1097/00005392-200102000-00095>.

[43] M.D. Mueller, J.L. Vigne, E.A. Pritts, V. Chao, E. Dreher, R.N. Taylor, Progestins activate vascular endothelial growth factor gene transcription in endometrial adenocarcinoma cells, Fertil Steril 79 (2003) 386–392. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(02\)04577-6](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(02)04577-6).

[44] M.D. Mueller, J.L. Vigne, A. Minchenko, D.I. Lebovic, D.C. Leitman, R.N. Taylor, Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors alpha and beta, Proc Natl Acad Sci U S A 97 (2000) 10972–10977. <https://doi.org/10.1073/pnas.200377097>.

[45] H.P. Gerber, A. McMurtrey, J. Kowalski, M. Yan, B.A. Keyt, V. Dixit, N. Ferrara, Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation, J Biol Chem 273 (1998) 30336–30343. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.46.30336>.

[46] N.W. Gale, G.D. Yancopoulos, Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development, Genes Dev 13 (1999) 1055–1066. <https://doi.org/10.1101/gad.13.9.1055>.

[47] N.P.J. Brindle, P. Saharinen, K. Alitalo, Signaling and functions of angiopoietin-1 in vascular protection, Circ Res 98 (2006) 1014–1023. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000218275.54089.12>.

- [48] R.P. Visconti, C.D. Richardson, T.N. Sato, Orchestration of angiogenesis and arteriovenous contribution by angiopoietins and vascular endothelial growth factor (VEGF), *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 8219–8224. <https://doi.org/10.1073/pnas.122109599>.
- [49] P.C. Maisonpierre, C. Suri, P.F. Jones, S. Bartunkova, S.J. Wiegand, C. Radziejewski, D. Compton, J. McClain, T.H. Aldrich, N. Papadopoulos, T.J. Daly, S. Davis, T.N. Sato, G.D. Yancopoulos, Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis, *Science* 277 (1997) 55–60. <https://doi.org/10.1126/science.277.5322.55>.
- [50] P. Levéen, M. Pekny, S. Gebre-Medhin, B. Swolin, E. Larsson, C. Betsholtz, Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities, *Genes Dev* 8 (1994) 1875–1887. <https://doi.org/10.1101/gad.8.16.1875>.
- [51] M. Fruttiger, L. Karlsson, A.C. Hall, A. Abramsson, A.R. Calver, H. Boström, K. Willetts, C.H. Bertold, J.K. Heath, C. Betsholtz, W.D. Richardson, Defective oligodendrocyte development and severe hypomyelination in PDGF-A knockout mice, *Development* 126 (1999) 457–467. <https://doi.org/10.1242/dev.126.3.457>.
- [52] L. Gnessi, S. Basciani, S. Mariani, M. Arizzi, G. Spera, C. Wang, C. Bondjers, L. Karlsson, C. Betsholtz, Leydig cell loss and spermatogenic arrest in platelet-derived growth factor (PDGF)-A-deficient mice, *J Cell Biol* 149 (2000) 1019–1026. <https://doi.org/10.1083/jcb.149.5.1019>.
- [53] H.N. Antoniades, D. Stathakos, C.D. Scher, Isolation of a cationic polypeptide from human serum that stimulates proliferation of 3T3 cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 72 (1975) 2635–2639. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.7.2635>.
- [54] E.W. Raines, R. Ross, Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis, *Br Heart J* 69 (1993) S30-37. [https://doi.org/10.1136/hrt.69.1\\_suppl.s30](https://doi.org/10.1136/hrt.69.1_suppl.s30).
- [55] C.-H. Heldin, U. Eriksson, A. Ostman, New members of the platelet-derived growth factor family of mitogens, *Arch Biochem Biophys* 398 (2002) 284–290.

<https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2707>.

- [56] R.V. Hoch, P. Soriano, Roles of PDGF in animal development, *Development* 130 (2003) 4769–4784. <https://doi.org/10.1242/dev.00721>.
- [57] S. Song, A.J. Ewald, W. Stallcup, Z. Werb, G. Bergers, PDGFR $\beta$ + perivascular progenitor cells in tumours regulate pericyte differentiation and vascular survival, *Nat Cell Biol* 7 (2005) 870–879. <https://doi.org/10.1038/ncb1288>.
- [58] M. Hellström, M. Kalén, P. Lindahl, A. Abramsson, C. Betsholtz, Role of PDGF-B and PDGFR- $\beta$  in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse, *Development* 126 (1999) 3047–3055. <https://doi.org/10.1242/dev.126.14.3047>.
- [59] J. Schmahl, K. Rizzolo, P. Soriano, The PDGF signaling pathway controls multiple steroid-producing lineages, *Genes Dev* 22 (2008) 3255–3267. <https://doi.org/10.1101/gad.1723908>.
- [60] N. Pascuali, L. Scotti, D. Abramovich, G. Irusta, M. Di Pietro, D. Bas, M. Tesone, F. Parborell, Inhibition of platelet-derived growth factor (PDGF) receptor affects follicular development and ovarian proliferation, apoptosis and angiogenesis in prepubertal eCG-treated rats, *Mol Cell Endocrinol* 412 (2015) 148–158. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.04.021>.
- [61] L.S. Sleer, C.C. Taylor, Cell-type localization of platelet-derived growth factors and receptors in the postnatal rat ovary and follicle, *Biol Reprod* 76 (2007) 379–390. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.046854>.
- [62] E.E. Nilsson, C. Detzel, M.K. Skinner, Platelet-derived growth factor modulates the primordial to primary follicle transition, *Reproduction* 131 (2006) 1007–1015. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00978>.
- [63] H. Pinkas, B. Fisch, G. Rozansky, C. Felz, G. Kessler-Icekson, H. Krissi, S. Nitke, A. Ao, R. Abir, Platelet-derived growth factors (PDGF-A and -B) and their receptors in human fetal and

adult ovaries, Mol Hum Reprod 14 (2008) 199–206. <https://doi.org/10.1093/molehr/gan011>.

[64] J.-D. Lalau, C. Lacroix, Measurement of metformin concentration in erythrocytes: clinical implications, Diabetes Obes Metab 5 (2003) 93–98. <https://doi.org/10.1046/j.1463-1326.2003.00241.x>.

[65] G.G. Graham, J. Punt, M. Arora, R.O. Day, M.P. Doogue, J.K. Duong, T.J. Furlong, J.R. Greenfield, L.C. Greenup, C.M. Kirkpatrick, J.E. Ray, P. Timmins, K.M. Williams, Clinical pharmacokinetics of metformin, Clin Pharmacokinet 50 (2011) 81–98. <https://doi.org/10.2165/11534750-00000000-00000>.

[66] H. Koepsell, Role of organic cation transporters in drug-drug interaction, Expert Opin Drug Metab Toxicol 11 (2015) 1619–1633. <https://doi.org/10.1517/17425255.2015.1069274>.

[67] M. Di Pietro, C. Velazquez, M.E. Matzkin, M.B. Frungieri, M.G. Peña, I. de Zúñiga, N. Pascual, G. Irusta, M.S. Bianchi, F. Parborell, D. Abramovich, Metformin has a direct effect on ovarian cells that is dependent on organic cation transporters, Mol Cell Endocrinol 499 (2020) 110591. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110591>.

[68] 40th EASD Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes : Munich, Germany, 5-9 September 2004, Diabetologia 47 (2004) A1–A464. <https://doi.org/10.1007/BF03375463>.

[69] L.J. Pellatt, S. Rice, H.D. Mason, Phosphorylation and activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) by metformin in the human ovary requires insulin, Endocrinology 152 (2011) 1112–1118. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1429>.

[70] R. Rattan, R.P. Graham, J.L. Maguire, S. Giri, V. Shridhar, Metformin suppresses ovarian cancer growth and metastasis with enhancement of cisplatin cytotoxicity in vivo, Neoplasia 13 (2011) 483–491. <https://doi.org/10.1593/neo.11148>.

[71] H. Liao, Q. Zhou, Y. Gu, T. Duan, Y. Feng, Luteinizing hormone facilitates angiogenesis in

ovarian epithelial tumor cells and metformin inhibits the effect through the mTOR

signaling pathway, *Oncol Rep* 27 (2012) 1873–1878. <https://doi.org/10.3892/or.2012.1745>.

[72] J.J. Shank, K. Yang, J. Ghannam, L. Cabrera, C.J. Johnston, R.K. Reynolds, R.J. Buckanovich, Metformin targets ovarian cancer stem cells in vitro and in vivo, *Gynecol Oncol* 127 (2012) 390–397. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2012.07.115>.

[73] B. Wu, S. Li, L. Sheng, J. Zhu, L. Gu, H. Shen, D. La, B.D. Hamblly, S. Bao, W. Di, Metformin inhibits the development and metastasis of ovarian cancer, *Oncol Rep* 28 (2012) 903–908. <https://doi.org/10.3892/or.2012.1890>.

[74] M. Abdelsaid, J. Kaczmarek, M. Coucha, A. Ergul, Dual endothelin receptor antagonism with bosentan reverses established vascular remodeling and dysfunctional angiogenesis in diabetic rats: relevance to glycemic control, *Life Sci* 118 (2014) 268–273. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.01.008>.

[75] K. Dallaglio, A. Bruno, A.R. Cantelmo, A.I. Esposito, L. Ruggiero, S. Orecchioni, A. Calleri, F. Bertolini, U. Pfeffer, D.M. Noonan, A. Albini, Paradoxical effects of metformin on endothelial cells and angiogenesis, *Carcinogenesis* 35 (2014) 1055–1066. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgu001>.

[76] J. Han, Y. Li, X. Liu, T. Zhou, H. Sun, P. Edwards, H. Gao, F.-S. Yu, X. Qiao, Metformin suppresses retinal angiogenesis and inflammation in vitro and in vivo, *PLoS One* 13 (2018) e0193031. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193031>.

[77] Y. Liu, G. Tang, Z. Zhang, Y. Wang, G.-Y. Yang, Metformin promotes focal angiogenesis and neurogenesis in mice following middle cerebral artery occlusion, *Neurosci Lett* 579 (2014) 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.07.006>.

[78] V.R. Venna, J. Li, M.D. Hammond, N.S. Mancini, L.D. McCullough, Chronic metformin treatment improves post-stroke angiogenesis and recovery after experimental stroke, *Eur J*

Neurosci 39 (2014) 2129–2138. <https://doi.org/10.1111/ejn.12556>.

[79] N. Takahashi, R. Shibata, N. Ouchi, M. Sugimoto, T. Murohara, K. Komori, Metformin stimulates ischemia-induced revascularization through an eNOS dependent pathway in the ischemic hindlimb mice model, J Vasc Surg 61 (2015) 489–496.

<https://doi.org/10.1016/j.jvs.2013.09.061>.

[80] M. Di Pietro, N. Pascuali, F. Parborell, D. Abramovich, Ovarian angiogenesis in polycystic ovary syndrome, Reproduction 155 (2018) R199–R209. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0597>.

[81] N. Soobryan, S. Murugesan, A. Pandiyan, J. Moodley, I. Mackraj, Angiogenic Dysregulation in Pregnancy-Related Hypertension-A Role for Metformin, Reprod Sci 25 (2018) 1531–1539. <https://doi.org/10.1177/1933719118773484>.

[82] L. Scotti, D. Abramovich, N. Pascuali, G. Irusta, G. Meresman, M. Tesone, F. Parborell, Local VEGF inhibition prevents ovarian alterations associated with ovarian hyperstimulation syndrome, J Steroid Biochem Mol Biol 144 Pt B (2014) 392–401. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.08.013>.

[83] M. Di Pietro, F. Parborell, G. Irusta, N. Pascuali, D. Bas, M.S. Bianchi, M. Tesone, D. Abramovich, Metformin regulates ovarian angiogenesis and follicular development in a female polycystic ovary syndrome rat model, Endocrinology 156 (2015) 1453–1463. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1765>.

[84] M. Mascarenhas, A.H. Balen, The high responder: a review of pathophysiology and outcomes during IVF treatment, Hum Fertil (Camb) 20 (2017) 155–167. <https://doi.org/10.1080/14647273.2017.1293851>.

[85] M. Foretz, B. Guigas, B. Viollet, Metformin: update on mechanisms of action and repurposing potential, Nat Rev Endocrinol 19 (2023) 460–476. <https://doi.org/10.1038/s41574-023-00833-4>.

- [86] A.L.G. Notaro, F.T.L. Neto, The use of metformin in women with polycystic ovary syndrome: an updated review, *J Assist Reprod Genet* 39 (2022) 573–579. <https://doi.org/10.1007/s10815-022-02429-9>.
- [87] R. Wartena, M. Matjila, Polycystic ovary syndrome and recurrent pregnancy loss, a review of literature, *Front Endocrinol (Lausanne)* 14 (2023) 1183060. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1183060>.
- [88] G. Tosti, A. Barberio, L. Tartaglione, A. Rizzi, M. Di Leo, L. Viti, A. Sirico, S. De Carolis, A. Pontecorvi, A. Lanzone, D. Pitocco, Lights and shadows on the use of metformin in pregnancy: from the preconception phase to breastfeeding and beyond, *Front. Endocrinol.* 14 (2023). <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1176623>.
- [89] S. Palomba, A. Falbo, G.B. La Sala, Metformin and gonadotropins for ovulation induction in patients with polycystic ovary syndrome: a systematic review with meta-analysis of randomized controlled trials, *Reprod Biol Endocrinol* 12 (2014) 3. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-3>.
- [90] S. Palomba, A. Falbo, G.B. La Sala, Effects of metformin in women with polycystic ovary syndrome treated with gonadotrophins for in vitro fertilisation and intracytoplasmic sperm injection cycles: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials, *BJOG* 120 (2013) 267–276. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.12070>.
- [91] T. Tang, J.M. Lord, R.J. Norman, E. Yasmin, A.H. Balen, Insulin-sensitising drugs (metformin, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) for women with polycystic ovary syndrome, oligo amenorrhoea and subfertility, *Cochrane Database Syst Rev* (2012) CD003053. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003053.pub5>.
- [92] E.S. Jungheim, A.O. Odibo, Fertility treatment in women with polycystic ovary syndrome: a decision analysis of different oral ovulation induction agents, *Fertil Steril* 94 (2010) 2659–2664.

[https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.03.077.](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.03.077)

[93] American Diabetes Association, 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018, Diabetes Care 41 (2018) S13–S27.

<https://doi.org/10.2337/dc18-S002>.

[94] C. Billionnet, D. Mitanchez, A. Weill, J. Nizard, F. Alla, A. Hartemann, S. Jacqueminet, Gestational diabetes and adverse perinatal outcomes from 716,152 births in France in 2012, Diabetologia 60 (2017) 636–644. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4206-6>.

[95] HAPO Study Cooperative Research Group, B.E. Metzger, L.P. Lowe, A.R. Dyer, E.R. Trimble, U. Chaovarindr, D.R. Coustan, D.R. Hadden, D.R. McCance, M. Hod, H.D. McIntyre, J.J.N. Oats, B. Persson, M.S. Rogers, D.A. Sacks, Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes, N Engl J Med 358 (2008) 1991–2002. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0707943>.

[96] National Collaborating Centre for Women’s and Children’s Health (UK), Diabetes in Pregnancy: Management of Diabetes and Its Complications from Preconception to the Postnatal Period, National Institute for Health and Care Excellence (UK), London, 2015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK293625/> (accessed November 14, 2024).

[97] M.Z. Liao, S.K. Flood Nichols, M. Ahmed, S. Clark, G.D. Hankins, S. Caritis, R. Venkataraman, D. Haas, S.K. Quinney, L.S. Haneline, A.T. Tita, T. Manuck, J. Wang, K.E. Thummel, L.M. Brown, Z. Ren, T.R. Easterling, M.F. Hebert, Effects of Pregnancy on the Pharmacokinetics of Metformin, Drug Metab Dispos 48 (2020) 264–271. <https://doi.org/10.1124/dmd.119.088435>.

[98] S. Eyal, T.R. Easterling, D. Carr, J.G. Umans, M. Miodovnik, G.D.V. Hankins, S.M. Clark, L. Risler, J. Wang, E.J. Kelly, D.D. Shen, M.F. Hebert, Pharmacokinetics of metformin during pregnancy, Drug Metab Dispos 38 (2010) 833–840. <https://doi.org/10.1124/dmd.109.031245>.

[99] J.E. Given, M. Loane, E. Garne, M.-C. Addor, M. Bakker, B. Bertaut-Nativel, M. Gatt, K.

- Klungsoyr, N. Lelong, M. Morgan, A.J. Neville, A. Pierini, A. Rissmann, H. Dolk, Metformin exposure in first trimester of pregnancy and risk of all or specific congenital anomalies: exploratory case-control study, BMJ 361 (2018) k2477. <https://doi.org/10.1136/bmj.k2477>.
- [100] C. M, D. M, D.G. E, L. P, C. M, First-trimester exposure to metformin and risk of birth defects: a systematic review and meta-analysis, Human Reproduction Update 20 (2014). <https://doi.org/10.1093/humupd/dmu022>.
- [101] D.S. Feig, L.E. Donovan, B. Zinman, J.J. Sanchez, E. Asztalos, E.A. Ryan, I.G. Fantus, E. Hutton, A.B. Armson, L.L. Lipscombe, D. Simmons, J.F.R. Barrett, P.J. Karanicolas, S. Tobin, H.D. McIntyre, S.Y. Tian, G. Tomlinson, K.E. Murphy, MiTy Collaborative Group, Metformin in women with type 2 diabetes in pregnancy (MiTy): a multicentre, international, randomised, placebo-controlled trial, Lancet Diabetes Endocrinol 8 (2020) 834–844. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(20\)30310-7](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(20)30310-7).
- [102] J.L. Tarry-Adkins, C.E. Aiken, S.E. Ozanne, Neonatal, infant, and childhood growth following metformin versus insulin treatment for gestational diabetes: A systematic review and meta-analysis, PLoS Med 16 (2019) e1002848. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002848>.
- [103] L.G.E. Hanem, Ø. Salvesen, P.B. Juliusson, S.M. Carlsen, M.C.F. Nossom, M.Ø. Vaage, R. Ødegård, E. Vanky, Intrauterine metformin exposure and offspring cardiometabolic risk factors (PedMet study): a 5-10 year follow-up of the PregMet randomised controlled trial, Lancet Child Adolesc Health 3 (2019) 166–174. [https://doi.org/10.1016/S2352-4642\(18\)30385-7](https://doi.org/10.1016/S2352-4642(18)30385-7).
- [104] J.A. Rowan, E.C. Rush, V. Obolonkin, M. Battin, T. Wouldes, W.M. Hague, Metformin in gestational diabetes: the offspring follow-up (MiG TOFU): body composition at 2 years of age, Diabetes Care 34 (2011) 2279–2284. <https://doi.org/10.2337/dc11-0660>.
- [105] S. Reagan-Shaw, M. Nihal, N. Ahmad, Dose translation from animal to human studies revisited, FASEB J 22 (2008) 659–661. <https://doi.org/10.1096/fj.07-9574LSF>.

- [106] D.P. Bagchi, O.A. MacDougald, Identification and Dissection of Diverse Mouse Adipose Depots, *J Vis Exp* (2019). <https://doi.org/10.3791/59499>.
- [107] T.K. Woodruff, R.J. Lyon, S.E. Hansen, G.C. Rice, J.P. Mather, Inhibin and activin locally regulate rat ovarian folliculogenesis, *Endocrinology* 127 (1990) 3196–3205. <https://doi.org/10.1210/endo-127-6-3196>.
- [108] C. Andreu, F. Parborell, S. Vanzulli, H. Chemes, M. Tesone, Regulation of follicular luteinization by a gonadotropin-releasing hormone agonist: relationship between steroidogenesis and apoptosis, *Mol Reprod Dev* 51 (1998) 287–294. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199811\)51:3<287::AID-MRD8>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199811)51:3<287::AID-MRD8>3.0.CO;2-L).
- [109] R. Sadrkhanloo, C. Hofeditz, G.F. Erickson, Evidence for widespread atresia in the hypophysectomized estrogen-treated rat, *Endocrinology* 120 (1987) 146–155. <https://doi.org/10.1210/endo-120-1-146>.
- [110] S.M. Briley, S. Jasti, J.M. McCracken, J.E. Hornick, B. Fegley, M.T. Pritchard, F.E. Duncan, Reproductive age-associated fibrosis in the stroma of the mammalian ovary, *Reproduction* 152 (2016) 245–260. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0129>.
- [111] C. Lliberos, S.H. Liew, P. Zareie, N.L. La Gruta, A. Mansell, K. Hutt, Evaluation of inflammation and follicle depletion during ovarian ageing in mice, *Sci Rep* 11 (2021) 278. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79488-4>.
- [112] M.D. Gómez-Elías, M.J. Munuce, L. Bahamondes, P.S. Cuasnicú, D.J. Cohen, In vitro and in vivo effects of ulipristal acetate on fertilization and early embryo development in mice, *Hum Reprod* 31 (2016) 53–59. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev287>.
- [113] G.T. Erbach, J.A. Lawitts, V.E. Papaioannou, J.D. Biggers, Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media, *Biol Reprod* 50 (1994) 1027–1033. <https://doi.org/10.1095/biolreprod50.5.1027>.

- [114] B. Sonntag, M. Götte, P. Wülfing, A.N. Schüring, L. Kiesel, R.R. Greb, Metformin alters insulin signaling and viability of human granulosa cells, *Fertil Steril* 84 Suppl 2 (2005) 1173–1179.  
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.04.043>.
- [115] L. Tosca, S. Uzbekova, C. Chabrolle, J. Dupont, Possible Role of 5'AMP-Activated Protein Kinase in the Metformin-Mediated Arrest of Bovine Oocytes at the Germinal Vesicle Stage During In Vitro Maturation1, *Biology of Reproduction* 77 (2007) 452–465.  
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.060848>.
- [116] M. Faure, M.J. Bertoldo, R. Khoueiry, A. Bongrani, F. Brion, C. Giulivi, J. Dupont, P. Froment, Metformin in Reproductive Biology, *Front Endocrinol (Lausanne)* 9 (2018) 675.  
<https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00675>.
- [117] I. Szymczak-Pajor, S. Wenclewska, A. Śliwińska, Metabolic Action of Metformin, *Pharmaceuticals (Basel)* 15 (2022) 810. <https://doi.org/10.3390/ph15070810>.
- [118] K. Schmitz, E.-M. Turnwald, T. Kretschmer, R. Janoschek, I. Bae-Gartz, K. Voßbrecher, M.D. Kammerer, A. König, A. Gellhaus, M. Handwerk, M. Wohlfarth, D. Gründemann, E. Hucklenbruch-Rother, J. Dötsch, S. Appel, Metformin Prevents Key Mechanisms of Obesity-Related Complications in Visceral White Adipose Tissue of Obese Pregnant Mice, *Nutrients* 14 (2022) 2288. <https://doi.org/10.3390/nu14112288>.
- [119] J. Jung, J. Park, M. Lee, J. Kim, D. Oh, W. Jun, O.-K. Kim, J. Lee, Salacia reticulata Extract Suppresses Fat Accumulation by Regulating Lipid Metabolism, *Foods* 12 (2023) 3149.  
<https://doi.org/10.3390/foods12173149>.
- [120] D.A. Landry, E. Yakubovich, D.P. Cook, S. Fasih, J. Upham, B.C. Vanderhyden, Metformin prevents age-associated ovarian fibrosis by modulating the immune landscape in female mice, *Sci Adv* 8 (2022) eabq1475. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abq1475>.
- [121] K.N. Phoenix, F. Vumbaca, K.P. Claffey, Therapeutic metformin/AMPK activation

promotes the angiogenic phenotype in the ERalpha negative MDA-MB-435 breast cancer model, *Breast Cancer Res Treat* 113 (2009) 101–111. <https://doi.org/10.1007/s10549-008-9916-5>.

[122] A. Cittadini, R. Napoli, M.G. Monti, D. Rea, S. Longobardi, P.A. Netti, M. Walser, M. Samà, G. Aimaretti, J. Isgaard, L. Saccà, Metformin prevents the development of chronic heart failure in the SHHF rat model, *Diabetes* 61 (2012) 944–953. <https://doi.org/10.2337/db11-1132>.

[123] M.J. Martin, R. Hayward, A. Viros, R. Marais, Metformin accelerates the growth of BRAF V600E-driven melanoma by upregulating VEGF-A, *Cancer Discov* 2 (2012) 344–355. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-11-0280>.

[124] Y. Ren, H. Luo, Metformin: The next angiogenesis panacea?, *SAGE Open Med* 9 (2021) 20503121211001641. <https://doi.org/10.1177/20503121211001641>.

[125] S. Orecchioni, F. Reggiani, G. Talarico, P. Mancuso, A. Calleri, G. Gregato, V. Labanca, D.M. Noonan, K. Dallaglio, A. Albini, F. Bertolini, The biguanides metformin and phenformin inhibit angiogenesis, local and metastatic growth of breast cancer by targeting both neoplastic and microenvironment cells, *Int J Cancer* 136 (2015) E534-544. <https://doi.org/10.1002/ijc.29193>.

[126] Y. Yang, G. Jin, H. Liu, K. Liu, J. Zhao, X. Chen, D. Wang, R. Bai, X. Li, Y. Jang, J. Lu, Y. Xing, Z. Dong, Metformin inhibits esophageal squamous cell carcinoma-induced angiogenesis by suppressing JAK/STAT3 signaling pathway, *Oncotarget* 8 (2017) 74673–74687. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20341>.

[127] M.G. Moschetta, C. Leonel, L.B. Maschio-Signorini, T.F. Borin, G.B. Gelaleti, B.V. Jardim-Perassi, L.C. Ferreira, N.M. Sonehara, L.G.S. Carvalho, E. Hellmén, D.A.P. de Campos Zuccari, Evaluation of Angiogenesis Process after Metformin and LY294002 Treatment in Mammary Tumor, *Anticancer Agents Med Chem* 19 (2019) 655–666. <https://doi.org/10.2174/1871520619666181218164050>.

- [128] J.-C. Wang, G.-Y. Li, B. Wang, S.-X. Han, X. Sun, Y.-N. Jiang, Y.-W. Shen, C. Zhou, J. Feng, S.-Y. Lu, J.-L. Liu, M.-D. Wang, P.-J. Liu, Metformin inhibits metastatic breast cancer progression and improves chemosensitivity by inducing vessel normalization via PDGF-B downregulation, *J Exp Clin Cancer Res* 38 (2019) 235. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1211-2>.
- [129] A. Karatas, C. Celik, B. Oz, Z.A. Akar, E.O. Etem, A.F. Dagli, S.S. Koca, Secukinumab and metformin ameliorate dermal fibrosis by decreasing tissue interleukin-17 levels in bleomycin-induced dermal fibrosis, *Int J Rheum Dis* 24 (2021) 795–802. <https://doi.org/10.1111/1756-185X.14114>.
- [130] A. Malaekah-Nikouei, S. Shokri-Naei, S. Karbasforoushan, H. Bahari, V. Baradaran Rahimi, R. Heidari, V.R. Askari, Metformin beyond an anti-diabetic agent: A comprehensive and mechanistic review on its effects against natural and chemical toxins, *Biomed Pharmacother* 165 (2023) 115263. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115263>.
- [131] L. Guo, J. Ma, J. Tang, D. Hu, W. Zhang, X. Zhao, Comparative Efficacy and Safety of Metformin, Glyburide, and Insulin in Treating Gestational Diabetes Mellitus: A Meta-Analysis, *J Diabetes Res* 2019 (2019) 9804708. <https://doi.org/10.1155/2019/9804708>.
- [132] J.A. Ainuddin, N. Karim, S. Zaheer, S.S. Ali, A.A. Hasan, Metformin treatment in type 2 diabetes in pregnancy: an active controlled, parallel-group, randomized, open label study in patients with type 2 diabetes in pregnancy, *J Diabetes Res* 2015 (2015) 325851. <https://doi.org/10.1155/2015/325851>.
- [133] E. Vanky, S. Stridsklev, R. Heimstad, P. Romundstad, K. Skogøy, O. Kleggetveit, S. Hjelle, P. von Brandis, T. Eikeland, K. Flo, K.F. Berg, G. Bunford, A. Lund, C. Bjerke, I. Almås, A.H. Berg, A. Danielson, G. Lahmami, S.M. Carlsen, Metformin versus placebo from first trimester to delivery in polycystic ovary syndrome: a randomized, controlled multicenter study, *J Clin Endocrinol Metab* 95 (2010) E448-455. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-0853>.

[134] T.S. Løvvik, S.M. Carlsen, Ø. Salvesen, B. Steffensen, M. Bixo, F. Gómez-Real, M. Lønnebotn, K.V. Hestvold, R. Zabielska, A.L. Hirschberg, A. Trouva, S. Thorarinsdottir, S. Hjelle, A.H. Berg, F. Andræ, I.S. Poromaa, J. Mohlin, M. Underdal, E. Vanky, Use of metformin to treat pregnant women with polycystic ovary syndrome (PregMet2): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial, *Lancet Diabetes Endocrinol* 7 (2019) 256–266.  
[https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(19\)30002-6](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(19)30002-6).

[135] B. Charles, R. Norris, X. Xiao, W. Hague, Population pharmacokinetics of metformin in late pregnancy, *Ther Drug Monit* 28 (2006) 67–72.  
<https://doi.org/10.1097/01.ftd.0000184161.52573.0e>.

[136] V. Tocci, M. Mirabelli, A. Salatino, L. Sicilia, S. Giuliano, F.S. Brunetti, E. Chiefari, G. De Sarro, D.P. Foti, A. Brunetti, Metformin in Gestational Diabetes Mellitus: To Use or Not to Use, That Is the Question, *Pharmaceutics* (Basel) 16 (2023) 1318.  
<https://doi.org/10.3390/ph16091318>.

[137] G. Jorquera, B. Echiburú, N. Crisosto, R. Sotomayor-Zárate, M. Maliqueo, G. Cruz, Metformin during Pregnancy: Effects on Offspring Development and Metabolic Function, *Front Pharmacol* 11 (2020) 653. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00653>.

[138] R. Malek, S.N. Davis, Is metformin safe in pregnancy: a focus on offspring outcomes, *Expert Opin Drug Saf* 24 (2025) 5–8. <https://doi.org/10.1080/14740338.2024.2424410>.

[139] R. Haber, F. Zarzour, M. Ghezzawi, N. Saadeh, D.S. Bacha, L. Al Jebbawi, M. Chakhtoura, C.S. Mantzoros, The impact of metformin on weight and metabolic parameters in patients with obesity: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials, *Diabetes Obes Metab* 26 (2024) 1850–1867. <https://doi.org/10.1111/dom.15501>.

[140] C. Velazquez, Y. Herrero, M.S. Bianchi, D.J. Cohen, P. Cuasnicu, K. Prost, R. Marinoni, N. Pascual, F. Parborell, D. Abramovich, Beneficial effects of metformin on mice female fertility

after a high-fat diet intake, Molecular and Cellular Endocrinology 575 (2023) 111995.

<https://doi.org/10.1016/j.mce.2023.111995>.

[141] C. Chiswick, R.M. Reynolds, F. Denison, A.J. Drake, S. Forbes, D.E. Newby, B.R. Walker, S. Quenby, S. Wray, A. Weeks, H. Lashen, A. Rodriguez, G. Murray, S. Whyte, J.E. Norman, Effect of metformin on maternal and fetal outcomes in obese pregnant women (EMPOWaR): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial, Lancet Diabetes Endocrinol 3 (2015) 778–786. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(15\)00219-3](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(15)00219-3).

[142] A. Syngelaki, K.H. Nicolaides, J. Balani, S. Hyer, R. Akolekar, R. Kotecha, A. Pastides, H. Shehata, Metformin versus Placebo in Obese Pregnant Women without Diabetes Mellitus, N Engl J Med 374 (2016) 434–443. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1509819>.

[143] E. Vanky, K.A. Salvesen, R. Heimstad, K.J. Fougnier, P. Romundstad, S.M. Carlsen, Metformin reduces pregnancy complications without affecting androgen levels in pregnant polycystic ovary syndrome women: results of a randomized study, Hum Reprod 19 (2004) 1734–1740. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh347>.

[144] S. Francisca, A.-F. Gloria, P.-B. Marco, N.-C. Camila, C. Víctor, K. Bredford, Metformin exposure during pregnancy and lactation affects offspring's long-term body weight and adipose tissue mass independent of the maternal metabolic state, Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis 1870 (2024) 167258. <https://doi.org/10.1016/j.bbadi.2024.167258>.

[145] L. Yang, L. Lacey, S. Whyte, S. Quenby, F.C. Denison, N. Dhaun, J.E. Norman, A.J. Drake, R.M. Reynolds, Metformin in obese pregnancy has no adverse effects on cardiovascular risk in early childhood, J Dev Orig Health Dis 13 (2022) 390–394. <https://doi.org/10.1017/S2040174421000301>.

[146] O. Panagiotopoulou, A. Syngelaki, G. Georgopoulos, J. Simpson, R. Akolekar, H. Shehata, K. Nicolaides, M. Charakida, Cardiometabolic Follow Up of the Offspring From the Metformin in

Obese      Non-Diabetic      Pregnant      (MOP)      Women      Trial,      (2019).

<https://doi.org/10.2139/ssrn.3387525>.

[147] D.S. Feig, J.J. Sanchez, K.E. Murphy, E. Asztalos, B. Zinman, D. Simmons, A.M. Haqq, I.G. Fantus, L. Lipscombe, A. Armson, J. Barrett, L. Donovan, P. Karanicolas, S. Tobin, K. Mangoff, G. Klein, Y. Jiang, G. Tomlinson, J. Hamilton, MiTy Kids Collaborative Group, Outcomes in children of women with type 2 diabetes exposed to metformin versus placebo during pregnancy (MiTy Kids): a 24-month follow-up of the MiTy randomised controlled trial, *Lancet Diabetes Endocrinol* 11 (2023) 191–202. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(23\)00004-9](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(23)00004-9).

[148] L.G.E. Hanem, S. Stridsklev, P.B. Júlíusson, Ø. Salvesen, M. Roelants, S.M. Carlsen, R. Ødegård, E. Vanky, Metformin Use in sops Pregnancies Increases the Risk of Offspring Overweight at 4 Years of Age: Follow-Up of Two RCTs, *J Clin Endocrinol Metab* 103 (2018) 1612–1621. <https://doi.org/10.1210/jc.2017-02419>.

[149] J.A. Rowan, E.C. Rush, L.D. Plank, J. Lu, V. Obolonkin, S. Coat, W.M. Hague, Metformin in gestational diabetes: the offspring follow-up (MiG TOFU): body composition and metabolic outcomes at 7-9 years of age, *BMJ Open Diabetes Res Care* 6 (2018) e000456. <https://doi.org/10.1136/bmjdrc-2017-000456>.

[150] Q. Xu, Q. Xie, Long-term effects of prenatal exposure to metformin on the health of children based on follow-up studies of randomized controlled trials: a systematic review and meta-analysis, *Arch Gynecol Obstet* 299 (2019) 1295–1303. <https://doi.org/10.1007/s00404-019-05124-w>.

[151] J.H. Toft, I. Økland, Metformin use in pregnancy: What about long-term effects in offspring?, *Acta Obstet Gynecol Scand* 103 (2024) 1238–1241. <https://doi.org/10.1111/aogs.14878>.

[152] E.G.M. van Hoorn, D. Rademaker, A.W.T. van der Wel, J.H. DeVries, A. Franx, B.B. van Rijn,

A. Kooy, S.E. Siegelaar, T.J. Roseboom, S.E. Ozanne, C.R. Hooijmans, R.C. Painter, <em>Diabetic Medicine</em> | Diabetes UK Journal | Wiley Online Library, (n.d.).  
<https://doi.org/10.1111/dme.15243>.

[153] Y. Xie, L. Xiao, S. Li, Effects of Metformin on Reproductive, Endocrine, and Metabolic Characteristics of Female Offspring in a Rat Model of Letrozole-Induced Polycystic Ovarian Syndrome With Insulin Resistance, Front. Endocrinol. 12 (2021).  
<https://doi.org/10.3389/fendo.2021.701590>.

[154] S. Forcato, B.G. Montagnini, M.L.M. De Góes, D.R.B. Da Silva Novi, A.C. Inhasz Kiss, G.S. Ceravolo, D.C. Ceccatto Gerardin, Reproductive evaluations in female rat offspring exposed to metformin during intrauterine and intrauterine/lactational periods, Reproductive Toxicology 87 (2019) 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2019.04.009>.

[155] M.C. Faure, R. Khoueiry, J. Quanico, H. Acloque, M.-J. Guerquin, M.J. Bertoldo, C. Chevaleyre, C. Ramé, I. Fournier, M. Salzet, J. Dupont, P. Froment, In Utero Exposure to Metformin Reduces the Fertility of Male Offspring in Adulthood, Front Endocrinol (Lausanne) 12 (2021) 750145. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.750145>.

[156] S. Forcato, D.R.B. da S. Novi, N.O. Costa, L.I. Borges, M.L.M. de Góes, G.S. Ceravolo, D.C.C. Gerardin, *In utero* and lactational exposure to metformin induces reproductive alterations in male rat offspring, Reproductive Toxicology 74 (2017) 48–58.  
<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.08.023>.

[157] H. Soraya, N. Esfahanian, Y. Shakiba, M. Ghazi-Khansari, B. Nikbin, H. Hafezzadeh, N. Maleki Dizaji, A. Garjani, Anti-angiogenic Effects of Metformin, an AMPK Activator, on Human Umbilical Vein Endothelial Cells and on Granulation Tissue in Rat, Iran J Basic Med Sci 15 (2012) 1202–1209.

[158] C. Ersoy, S. Kiyici, F. Budak, B. Oral, M. Guclu, C. Duran, H. Selimoglu, E. Erturk, E. Tuncel,

S. Imamoglu, The effect of metformin treatment on VEGF and PAI-1 levels in obese type 2 diabetic patients, *Diabetes Research and Clinical Practice* 81 (2008) 56–60.  
<https://doi.org/10.1016/j.diabres.2008.02.006>.

[159] A. Iwase, Y. Hasegawa, Y. Tsukui, M. Kobayashi, H. Hiraishi, T. Nakazato, Y. Kitahara, Anti-Müllerian hormone beyond an ovarian reserve marker: the relationship with the physiology and pathology in the life-long follicle development, *Front Endocrinol (Lausanne)* 14 (2023) 1273966.

<https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1273966>.

[160] S. Ji, B. Al, A. Z, T. A, D. A, Z. W, C. M, C. A, S. S, M. Kh, Maternal Metabolic Syndrome Programs Mitochondrial Dysfunction via Germline Changes across Three Generations, *Cell Reports* 16 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.065>.

[161] A. Horwitz, R. Birk, Adipose Tissue Hyperplasia and Hypertrophy in Common and Syndromic Obesity-The Case of BBS Obesity, *Nutrients* 15 (2023) 3445.  
<https://doi.org/10.3390/nu15153445>.

[162] J.N. Fain, Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells, *Vitam Horm* 74 (2006) 443–477. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(06\)74018-3](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(06)74018-3).

[163] J.-P. Bastard, M. Maachi, C. Lagathu, M.J. Kim, M. Caron, H. Vidal, J. Capeau, B. Feve, Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance, *Eur Cytokine Netw* 17 (2006) 4–12.

[164] M.F. Landecho, C. Tuero, V. Valentí, I. Bilbao, M. de la Higuera, G. Frühbeck, Relevance of Leptin and Other Adipokines in Obesity-Associated Cardiovascular Risk, *Nutrients* 11 (2019) 2664. <https://doi.org/10.3390/nu11112664>.

[165] P. Trayhurn, Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity, *Physiol Rev* 93 (2013) 1–21. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2012>.

- [166] A.Y. Lemoine, S. Ledoux, E. Larger, Adipose tissue angiogenesis in obesity, *Thromb Haemost* 110 (2013) 661–668. <https://doi.org/10.1160/TH13-01-0073>.
- [167] M.C. Fragozo-Ramos, Síndrome metabólico: revisión de la literatura, *Med. Lab.* 26 (2022) 47–62. <https://doi.org/10.36384/01232576.559>.
- [168] CDC, National Diabetes Statistics Report, Diabetes (2024).  
<https://www.cdc.gov/diabetes/php/data-research/index.html> (accessed November 22, 2024).
- [169] Obesity and overweight, (n.d.). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (accessed November 22, 2024).
- [170] K. Esposito, P. Chiodini, A. Colao, A. Lenzi, D. Giugliano, Metabolic syndrome and risk of cancer: a systematic review and meta-analysis, *Diabetes Care* 35 (2012) 2402–2411.  
<https://doi.org/10.2337/dc12-0336>.
- [171] C.M. Boney, A. Verma, R. Tucker, B.R. Vohr, Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus, *Pediatrics* 115 (2005) e290-296. <https://doi.org/10.1542/peds.2004-1808>.
- [172] E. Oken, S.L. Rifas-Shiman, A.E. Field, A.L. Frazier, M.W. Gillman, Maternal gestational weight gain and offspring weight in adolescence, *Obstet Gynecol* 112 (2008) 999–1006.  
<https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e31818a5d50>.
- [173] J.A. Armitage, L. Poston, P.D. Taylor, Developmental origins of obesity and the metabolic syndrome: the role of maternal obesity, *Front Horm Res* 36 (2008) 73–84.  
<https://doi.org/10.1159/000115355>.
- [174] V. Grandjean, S. Fourré, D.A.F. De Abreu, M.-A. Derieppe, J.-J. Remy, M. Rassoulzadegan, RNA-mediated paternal heredity of diet-induced obesity and metabolic disorders, *Sci Rep* 5 (2015) 18193. <https://doi.org/10.1038/srep18193>.
- [175] Q. Chen, M. Yan, Z. Cao, X. Li, Y. Zhang, J. Shi, G. Feng, H. Peng, X. Zhang, Y. Zhang, J. Qian,

E. Duan, Q. Zhai, Q. Zhou, Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder, Science 351 (2016) 397–400.  
<https://doi.org/10.1126/science.aad7977>.

[176] S. Della Torre, V. Benedusi, R. Fontana, A. Maggi, Energy metabolism and fertility: a balance preserved for female health, Nat Rev Endocrinol 10 (2014) 13–23.  
<https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.203>.

[177] S. Shalitin, M. Phillip, Role of obesity and leptin in the pubertal process and pubertal growth--a review, Int J Obes Relat Metab Disord 27 (2003) 869–874.  
<https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802328>.

[178] J.N. Zurita Cruz, I. Díaz Rodríguez, E. Nishimura Meguro, M.Á. Villasis Keever, A. De Jesús Rivera Hernández, E. Garrido Magaña, Change in body mass index among girls with precocious puberty under treatment, Arch Argent Pediatr 114 (2016) 143–145.  
<https://doi.org/10.5546/aap.2016.eng.143>.

[179] K. Michalakis, G. Mintziori, A. Kaprara, B.C. Tarlatzis, D.G. Goulis, The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: a narrative review, Metabolism 62 (2013) 457–478. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2012.08.012>.

[180] N. Santoro, B. Lasley, D. McConnell, J. Allsworth, S. Crawford, E.B. Gold, J.S. Finkelstein, G.A. Greendale, J. Kelsey, S. Korenman, J.L. Luborsky, K. Matthews, R. Midgley, L. Powell, J. Sabatine, M. Schocken, M.F. Sowers, G. Weiss, Body size and ethnicity are associated with menstrual cycle alterations in women in the early menopausal transition: The Study of Women's Health across the Nation (SWAN) Daily Hormone Study, J Clin Endocrinol Metab 89 (2004) 2622–2631. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-031578>.

[181] J.E. Chavarro, J.W. Rich-Edwards, B.A. Rosner, W.C. Willett, Diet and lifestyle in the prevention of ovulatory disorder infertility, Obstet Gynecol 110 (2007) 1050–1058.

<https://doi.org/10.1097/01.AOG.0000287293.25465.e1>.

[182] M.A.M. Hassan, S.R. Killick, Negative lifestyle is associated with a significant reduction in fecundity, *Fertil Steril* 81 (2004) 384–392. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2003.06.027>.

[183] F. Grodstein, M.B. Goldman, D.W. Cramer, Body mass index and ovulatory infertility, *Epidemiology* 5 (1994) 247–250. <https://doi.org/10.1097/00001648-199403000-00016>.

[184] D.E. Broughton, K.H. Moley, Obesity and female infertility: potential mediators of obesity's impact, *Fertil Steril* 107 (2017) 840–847.

<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.01.017>.

[185] A. Maheshwari, L. Stofberg, S. Bhattacharya, Effect of overweight and obesity on assisted reproductive technology--a systematic review, *Hum Reprod Update* 13 (2007) 433–444.

<https://doi.org/10.1093/humupd/dmm017>.

[186] J. Bellver, A. Pellicer, J.A. García-Velasco, A. Ballesteros, J. Remohí, M. Meseguer, Obesity reduces uterine receptivity: clinical experience from 9,587 first cycles of ovum donation with normal weight donors, *Fertil Steril* 100 (2013) 1050–1058.

<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.06.001>.

[187] M.P. Provost, K.S. Acharya, C.R. Acharya, J.S. Yeh, R.G. Steward, J.L. Eaton, J.M. Goldfarb, S.J. Muasher, Pregnancy outcomes decline with increasing body mass index: analysis of 239,127 fresh autologous in vitro fertilization cycles from the 2008-2010 Society for Assisted Reproductive Technology registry, *Fertil Steril* 105 (2016) 663–669.

<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.11.008>.

[188] R. Fontana, S. Della Torre, The Deep Correlation between Energy Metabolism and Reproduction: A View on the Effects of Nutrition for Women Fertility, *Nutrients* 8 (2016) 87.

<https://doi.org/10.3390/nu8020087>.

[189] G. De Pergola, S. Maldera, M. Tartagni, N. Pannacciulli, G. Loverro, R. Giorgino, Inhibitory

effect of obesity on gonadotropin, estradiol, and inhibin B levels in fertile women, *Obesity* (Silver Spring) 14 (2006) 1954–1960. <https://doi.org/10.1038/oby.2006.228>.

[190] S. Guo, Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms, *J Endocrinol* 220 (2014) T1–T23. <https://doi.org/10.1530/JOE-13-0327>.

[191] J.C. Fraulob, R. Ogg-Diamantino, C. Fernandes-Santos, M.B. Aguila, C.A. Mandarim-de-Lacerda, A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet, *J Clin Biochem Nutr* 46 (2010) 212–223. <https://doi.org/10.3164/jcbn.09-83>.

[192] L. Hooper, A. Abdelhamid, D. Bunn, T. Brown, C.D. Summerbell, C.M. Skeaff, Effects of total fat intake on body weight, *Cochrane Database of Systematic Reviews* (2015). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011834>.

[193] Healthy diet, (n.d.). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/healthy-diet> (accessed December 12, 2022).

[194] C.A. Aguilar-Salinas, T. Viveros-Ruiz, Recent advances in managing/understanding the metabolic syndrome, *F1000Res* 8 (2019) F1000 Faculty Rev-370. <https://doi.org/10.12688/f1000research.17122.1>.

[195] B. Harmancioğlu, S. Kabaran, Maternal high fat diets: impacts on offspring obesity and epigenetic hypothalamic programming, *Front Genet* 14 (2023) 1158089. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1158089>.

[196] B. Sun, R.H. Purcell, C.E. Terrillion, J. Yan, T.H. Moran, K.L.K. Tamashiro, Maternal High-Fat Diet During Gestation or Suckling Differentially Affects Offspring Leptin Sensitivity and Obesity, *Diabetes* 61 (2012) 2833–2841. <https://doi.org/10.2337/db11-0957>.

[197] G. Urbonaitė, A. Knyzelienė, F.S. Bunn, A. Smalskys, U. Neniskytė, The impact of maternal

high-fat diet on offspring neurodevelopment, *Front Neurosci* 16 (2022) 909762.

<https://doi.org/10.3389/fnins.2022.909762>.

[198] M.W. Tsoulis, P.E. Chang, C.J. Moore, K.A. Chan, W. Gohir, J.J. Petrik, M.H. Vickers, K.L.

Connor, D.M. Sloboda, Maternal High-Fat Diet-Induced Loss of Fetal Oocytes Is Associated with

Compromised Follicle Growth in Adult Rat Offspring, *Biol Reprod* 94 (2016) 94.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.135004>.

[199] W. Wei, F. Qin, J. Gao, J. Chang, X. Pan, X. Jiang, L. Che, Y. Zhuo, D. Wu, S. Xu, The effect

of maternal consumption of high-fat diet on ovarian development in offspring, *Anim Reprod Sci*

255 (2023) 107294. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2023.107294>.

[200] E. Diamanti-Kandarakis, A. Bergiele, The influence of obesity on hyperandrogenism and

infertility in the female, *Obes Rev* 2 (2001) 231–238. <https://doi.org/10.1046/j.1467-789x.2001.00041.x>.

[201] A. Talmor, B. Dunphy, Female obesity and infertility, *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*

29 (2015) 498–506. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2014.10.014>.

[202] N.M. Hohos, K.J. Cho, D.C. Swindle, M.E. Skaznik-Wikiel, High-fat diet exposure, regardless

of induction of obesity, is associated with altered expression of genes critical to normal

ovulatory function, *Mol Cell Endocrinol* 470 (2018) 199–207.

<https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.10.016>.

[203] P.-K. Yang, C.-H. Chou, C.-C. Huang, W.-F. Wen, H.-F. Chen, C.-T. Shun, H.-N. Ho, M.-J.

Chen, Obesity alters ovarian folliculogenesis through disrupted angiogenesis from increased IL-

10 production, *Mol Metab* 49 (2021) 101189. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101189>.

[204] L. Yang, L. Chen, X. Lu, A. Tan, Y. Chen, Y. Li, X. Peng, S. Yuan, D. Cai, Y. Yu, Peri-ovarian

adipose tissue contributes to intraovarian control during folliculogenesis in mice, *Reproduction*

156 (2018) 133–144. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0120>.

[205] M.E. Lenert, M.M. Chaparro, M.D. Burton, Homeostatic Regulation of Estrus Cycle of Young Female Mice on Western Diet, *J Endocr Soc* 5 (2021) bvab010. <https://doi.org/10.1210/jendso/bvab010>.

[206] T.R. Chakraborty, L. Donthireddy, D. Adhikary, S. Chakraborty, Long-Term High Fat Diet Has a Profound Effect on Body Weight, Hormone Levels, and Estrous Cycle in Mice, *Med Sci Monit* 22 (2016) 1601–1608. <https://doi.org/10.12659/msm.897628>.

[207] M.E.K. Lie, A. Overgaard, J.D. Mikkelsen, Effect of a postnatal high-fat diet exposure on puberty onset, estrous cycle regularity, and kisspeptin expression in female rats, *Reprod Biol* 13 (2013) 298–308. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2013.08.001>.

[208] T. Umehara, Y.E. Winstanley, E. Andreas, A. Morimoto, E.J. Williams, K.M. Smith, J. Carroll, M.A. Febbraio, M. Shimada, D.L. Russell, R.L. Robker, Female reproductive life span is extended by targeted removal of fibrotic collagen from the mouse ovary, *Sci Adv* 8 (2022) eabn4564. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abn4564>.

[209] B. Kopp, L. Khoury, M. Audebert, Validation of the γH2AX biomarker for genotoxicity assessment: a review, *Arch Toxicol* 93 (2019) 2103–2114. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02511-9>.

[210] G. Onalan, B. Selam, Y. Baran, M. Cincik, R. Onalan, U. Gündüz, A.U. Ural, R. Pabuccu, Serum and follicular fluid levels of soluble Fas, soluble Fas ligand and apoptosis of luteinized granulosa cells in PCOS patients undergoing IVF, *Hum Reprod* 20 (2005) 2391–2395. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei068>.

[211] M. Abizadeh, M.G. Novin, F. Amidi, S.A. Ziae, M.A. Abdollahifar, H. Nazarian, Potential of Auraptene in Improvement of Oocyte Maturation, Fertilization Rate, and Inflammation in Polycystic Ovary Syndrome Mouse Model, *Reprod Sci* 27 (2020) 1742–1751. <https://doi.org/10.1007/s43032-020-00168-9>.

- [212] J. Yu, C. Ding, Z. Hua, X. Jiang, C. Wang, Protective effects of berberine in a rat model of polycystic ovary syndrome mediated via the PI3K/AKT pathway, *J Obstet Gynaecol Res* 47 (2021) 1789–1803. <https://doi.org/10.1111/jog.14730>.
- [213] C.-C. Huang, C.-H. Chou, Y.-S. Yang, H.-N. Ho, C.-T. Shun, W.-F. Wen, S.-U. Chen, M.-J. Chen, Metformin: a novel promising option for fertility preservation during cyclophosphamide-based chemotherapy, *Mol Hum Reprod* 27 (2021) gaaa084. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaaa084>.
- [214] J. Yao, Y. Ma, S. Zhou, T. Bao, Y. Mi, W. Zeng, J. Li, C. Zhang, Metformin Prevents Follicular Atresia in Aging Laying Chickens through Activation of PI3K/AKT and Calcium Signaling Pathways, *Oxid Med Cell Longev* 2020 (2020) 3648040. <https://doi.org/10.1155/2020/3648040>.
- [215] F. Zhou, L.-B. Shi, S.-Y. Zhang, Ovarian Fibrosis: A Phenomenon of Concern, *Chin Med J (Engl)* 130 (2017) 365–371. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.198931>.
- [216] E.H. Akamine, A.C. Marçal, J.P. Camporez, M.S. Hoshida, L.C. Caperuto, E. Bevilacqua, C.R.O. Carvalho, Obesity induced by high-fat diet promotes insulin resistance in the ovary, *J Endocrinol* 206 (2010) 65–74. <https://doi.org/10.1677/JOE-09-0461>.
- [217] A.O. Shpakov, Improvement Effect of Metformin on Female and Male Reproduction in *Endocrine Pathologies and Its Mechanisms, Pharmaceuticals* 14 (2021) 42. <https://doi.org/10.3390/ph14010042>.
- [218] J.A. Forsythe, B.H. Jiang, N.V. Iyer, F. Agani, S.W. Leung, R.D. Koos, G.L. Semenza, Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1, *Mol Cell Biol* 16 (1996) 4604–4613. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.9.4604>.
- [219] F. Coulet, S. Nadaud, M. Agrapart, F. Soubrier, Identification of hypoxia-response element in the human endothelial nitric-oxide synthase gene promoter, *J Biol Chem* 278 (2003) 46230–46240. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305420200>.

- [220] G. Thurston, C. Suri, K. Smith, J. McClain, T.N. Sato, G.D. Yancopoulos, D.M. McDonald, Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1, *Science* 286 (1999) 2511–2514. <https://doi.org/10.1126/science.286.5449.2511>.
- [221] Y. Wu, Y. Li, X. Liao, Z. Wang, R. Li, S. Zou, T. Jiang, B. Zheng, P. Duan, J. Xiao, Diabetes Induces Abnormal Ovarian Function via Triggering Apoptosis of Granulosa Cells and Suppressing Ovarian Angiogenesis, *Int J Biol Sci* 13 (2017) 1297–1308. <https://doi.org/10.7150/ijbs.21172>.
- [222] B.K. Tan, R. Adya, J. Chen, S. Farhatullah, D. Heutling, D. Mitchell, H. Lehnert, H.S. Randeva, Metformin decreases angiogenesis via NF-kappaB and Erk1/2/Erk5 pathways by increasing the antiangiogenic thrombospondin-1, *Cardiovasc Res* 83 (2009) 566–574. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp131>.
- [223] B.K. Tan, R. Adya, S. Farhatullah, J. Chen, H. Lehnert, H.S. Randeva, Metformin treatment may increase omentin-1 levels in women with polycystic ovary syndrome, *Diabetes* 59 (2010) 3023–3031. <https://doi.org/10.2337/db10-0124>.
- [224] M.E. Skaznik-Wikiel, D.C. Swindle, A.A. Allshouse, A.J. Polotsky, J.L. McManaman, High-Fat Diet Causes Subfertility and Compromised Ovarian Function Independent of Obesity in Mice, *Biol Reprod* 94 (2016) 108. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.137414>.
- [225] N.M. Hohos, E.M. Elliott, A. Giornazi, E. Silva, J.D. Rice, M.E. Skaznik-Wikiel, High-fat diet induces an ovulatory defect associated with dysregulated endothelin-2 in mice, *Reproduction* 161 (2021) 307–317. <https://doi.org/10.1530/REP-20-0290>.
- [226] C. Di Berardino, A. Peserico, G. Capacchietti, A. Zappacosta, N. Bernabò, V. Russo, A. Mauro, M. El Khatib, F. Gonnella, F. Konstantinidou, L. Stuppia, V. Gatta, B. Barboni, High-Fat Diet and Female Fertility across Lifespan: A Comparative Lesson from Mammal Models, *Nutrients* 14 (2022) 4341. <https://doi.org/10.3390/nu14204341>.
- [227] E. Gershon, N. Dekel, Newly Identified Regulators of Ovarian Folliculogenesis and

Ovulation, Int J Mol Sci 21 (2020) 4565. <https://doi.org/10.3390/ijms21124565>.

[228] M. Desai, M.G. Ross, Maternal-infant nutrition and development programming of offspring appetite and obesity, Nutrition Reviews 78 (2020) 25–31. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuaa121>.

[229] Frontiers | Maternal obesity induced metabolic disorders in offspring and myeloid reprogramming by epigenetic regulation, (n.d.). <https://www.frontiersin.org/journals/endocrinology/articles/10.3389/fendo.2023.1256075/fu> II (accessed January 29, 2025).

[230] K. Shankar, A. Harrell, X. Liu, J.M. Gilchrist, M.J.J. Ronis, T.M. Badger, Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 294 (2008) R528-538. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00316.2007>.

[231] K. Hasebe, M.D. Kendig, M.J. Morris, Mechanisms Underlying the Cognitive and Behavioural Effects of Maternal Obesity, Nutrients 13 (2021) 240. <https://doi.org/10.3390/nu13010240>.

[232] F. Cirulli, C. Musillo, A. Berry, Maternal Obesity as a Risk Factor for Brain Development and Mental Health in the Offspring, Neuroscience 447 (2020) 122–135. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.01.023>.

[233] X.-Y. Lei, Y.-J. Li, J.-J. Ou, Y.-M. Li, Association between parental body mass index and autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis, Eur Child Adolesc Psychiatry 28 (2019) 933–947. <https://doi.org/10.1007/s00787-018-1259-0>.

[234] M.J. Nash, E. Dobrinskikh, T.K. Soderborg, R.C. Janssen, D.L. Takahashi, T.A. Dean, O. Varlamov, J.D. Hennebold, M. Gannon, K.M. Aagaard, C.E. McCurdy, P. Kievit, B.C. Bergman, K.L. Jones, E.M. Pietras, S.R. Wesolowski, J.E. Friedman, Maternal diet alters long-term innate immune cell memory in fetal and juvenile hematopoietic stem and progenitor cells in nonhuman

primate offspring, *Cell Rep* 42 (2023) 112393. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112393>.

[235] E.A.L. Enninga, J.S. Jang, B. Hur, E.L. Johnson, M.J. Wick, J. Sung, R. Chakraborty, Maternal obesity is associated with phenotypic alterations in fetal immune cells by single-cell mass cytometry, *Am J Reprod Immunol* 85 (2021) e13358. <https://doi.org/10.1111/aji.13358>.

[236] L.-H. Peng, Y. Tan, O. Bajinka, The influence of maternal diet on offspring's gut microbiota in early life, *Arch Gynecol Obstet* 309 (2024) 1183–1190. <https://doi.org/10.1007/s00404-023-07305-0>.

[237] M. Persson, N. Razaz, A.-K. Edstedt Bonamy, E. Villamor, S. Cnattingius, Maternal Overweight and Obesity and Risk of Congenital Heart Defects, *J Am Coll Cardiol* 73 (2019) 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.10.050>.

[238] C.L. Pankey, Q. Wang, J. King, S.P. Ford, Cardiovascular consequences of maternal obesity throughout the lifespan in first generation sheep, *PLoS One* 17 (2022) e0274214. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0274214>.

[239] A. Mouralidaran, J. Soeda, C. Visconti-Pugmire, A.-M. Samuelsson, J. Pombo, X. Maragkoudaki, A. Butt, R. Saraswati, M. Novelli, G. Fusai, L. Poston, P.D. Taylor, J.A. Oben, Maternal obesity programs offspring nonalcoholic fatty liver disease by innate immune dysfunction in mice, *Hepatology* 58 (2013) 128–138. <https://doi.org/10.1002/hep.26248>.

[240] C.E. McCurdy, J.M. Bishop, S.M. Williams, B.E. Grayson, M.S. Smith, J.E. Friedman, K.L. Grove, Maternal high-fat diet triggers lipotoxicity in the fetal livers of nonhuman primates, *J Clin Invest* 119 (2009) 323–335. <https://doi.org/10.1172/JCI32661>.

[241] H. Hagström, T.G. Simon, B. Roelstraete, O. Stephansson, J. Söderling, J.F. Ludvigsson, Maternal obesity increases the risk and severity of NAFLD in offspring, *J Hepatol* 75 (2021) 1042–1048. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.06.045>.

[242] M.G. Ross, M.P. Kavasery, M.K. Cervantes, G. Han, B. Horta, K.P. Coca, S.O. Costa, M.

Desai, High-Fat, High-Calorie Breast Milk in Women with Overweight or Obesity and Its Association with Maternal Serum Insulin Concentration and Triglycerides Levels, Children (Basel) 11 (2024) 141. <https://doi.org/10.3390/children11020141>.

[243] R. Yuhas, K. Pramuk, E.L. Lien, Human milk fatty acid composition from nine countries varies most in DHA, Lipids 41 (2006) 851–858. <https://doi.org/10.1007/s11745-006-5040-7>.

[244] E.R. Boersma, P.J. Offringa, F.A. Muskiet, W.M. Chase, I.J. Simmons, Vitamin E, lipid fractions, and fatty acid composition of colostrum, transitional milk, and mature milk: an international comparative study, Am J Clin Nutr 53 (1991) 1197–1204. <https://doi.org/10.1093/ajcn/53.5.1197>.

[245] S.J. Gardiner, C.M.J. Kirkpatrick, E.J. Begg, M. Zhang, M.P. Moore, D.J. Saville, Transfer of metformin into human milk, Clin Pharmacol Ther 73 (2003) 71–77. <https://doi.org/10.1067/mcp.2003.9>.

[246] Z. Carlson, H. Hafner, N. El Habbal, E. Harman, S. Liu, N. Botezatu, M. Alharastani, C. Rivet, H. Reynolds, N. Both, H. Sun, D. Bridges, B. Gregg, Short Term Changes in Dietary Fat Content and Metformin Treatment During Lactation Impact Milk Composition and Mammary Gland Morphology, J Mammary Gland Biol Neoplasia 27 (2022) 1–18. <https://doi.org/10.1007/s10911-022-09512-y>.

[247] K.P. Ratzmann, E. Steindel, R. Hildebrandt, R. Kohlhoff, Is there a relationship between metabolic control and glucose concentration in breast milk of type 1 (insulin-dependent) diabetic mothers?, Exp Clin Endocrinol 92 (1988) 32–36. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1210778>.

[248] S. Arslan, H. Yıldırın, C.M. Seymen, The Effect of Maternal High-Fat Diet on Adipose Tissue Histology and Lipid Metabolism-Related Genes Expression in Offspring Rats, Nutrients 16 (2024) 150. <https://doi.org/10.3390/nu16010150>.

[249] C. Saullo, L.L. da Cruz, D.C. Damasceno, G.T. Volpato, Y.K. Sinzato, B. Karki, F.Q. Gallego, G. Vesentini, Effects of a maternal high-fat diet on adipose tissue in murine offspring: A systematic review and meta-analysis, *Biochimie* 201 (2022) 18–32.  
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.06.009>.

[250] C. Savva, L.A. Helguero, M. González-Granillo, T. Melo, D. Couto, B. Buyandelger, S. Gustafsson, J. Liu, M.R. Domingues, X. Li, M. Korach-André, Maternal high-fat diet programs white and brown adipose tissue lipidome and transcriptome in offspring in a sex- and tissue-dependent manner in mice, *Int J Obes (Lond)* 46 (2022) 831–842.  
<https://doi.org/10.1038/s41366-021-01060-5>.

[251] J.M. Schoonejans, H.L. Blackmore, T.J. Ashmore, L.C. Pantaleão, L. Pellegrini Pisani, L. Dearden, J.A. Tadross, C.E. Aiken, D.S. Fernandez-Twinn, S.E. Ozanne, Sex-specific effects of maternal metformin intervention during glucose-intolerant obese pregnancy on body composition and metabolic health in aged mouse offspring, *Diabetologia* 65 (2022) 2132–2145.  
<https://doi.org/10.1007/s00125-022-05789-0>.

[252] J.M. Schoonejans, H.L. Blackmore, T.J. Ashmore, C.E. Aiken, D.S. Fernandez-Twinn, S.E. Ozanne, Maternal Metformin Intervention during Obese Glucose-Intolerant Pregnancy Affects Adiposity in Young Adult Mouse Offspring in a Sex-Specific Manner, *Int J Mol Sci* 22 (2021) 8104.  
<https://doi.org/10.3390/ijms22158104>.

[253] H. Yokomizo, T. Inoguchi, N. Sonoda, Y. Sakaki, Y. Maeda, T. Inoue, E. Hirata, R. Takei, N. Ikeda, M. Fujii, K. Fukuda, H. Sasaki, R. Takayanagi, Maternal high-fat diet induces insulin resistance and deterioration of pancreatic β-cell function in adult offspring with sex differences in mice, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 306 (2014) E1163-1175.  
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00688.2013>.

[254] J.M. Dodd, J. Louise, A.R. Deussen, R.M. Grivell, G. Dekker, A.J. McPhee, W. Hague, Effect

of metformin in addition to dietary and lifestyle advice for pregnant women who are overweight or obese: the GRoW randomised, double-blind, placebo-controlled trial, *Lancet Diabetes Endocrinol* 7 (2019) 15–24. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(18\)30310-3](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(18)30310-3).

[255] K.L. Connor, M.H. Vickers, J. Beltrand, M.J. Meaney, D.M. Sloboda, Nature, nurture or nutrition? Impact of maternal nutrition on maternal care, offspring development and reproductive function, *J Physiol* 590 (2012) 2167–2180. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.223305>.

[256] A. Ce, T.-A. Ji, P. Nc, D. L, O. Se, Decreased ovarian reserve, dysregulation of mitochondrial biogenesis, and increased lipid peroxidation in female mouse offspring exposed to an obesogenic maternal diet, *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 30 (2016). <https://doi.org/10.1096/fj.15-280800>.

[257] F. Hj, U. F, M. M, An overview of mechanisms of redox signaling, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 73 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.01.018>.

[258] C. Y, S. Kh, B. Kd, M. N, C. Fr, Diet-induced maternal obesity alters ovarian morphology and gene expression in the adult mouse offspring, *Fertility and Sterility* 102 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.06.015>.

[259] Impaired Angiogenic Function of Fetal Endothelial Progenitor Cells via PCDH10 in Gestational Diabetes Mellitus - PubMed, (n.d.). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38003275/> (accessed January 29, 2025).

[260] J.S. Son, X. Liu, Y. Chen, Q. Tian, L. Zhao, Y. Hu, S.A. Chae, J. Deavilla, M.-J. Zhu, M. Du, Exercise enhances placental angiogenesis of obese maternal mice, *The FASEB Journal* 33 (2019) 578.1-578.1. [https://doi.org/10.1096/fasebj.2019.33.1\\_supplement.578.1](https://doi.org/10.1096/fasebj.2019.33.1_supplement.578.1).

[261] T. Pentinat, M. Ramon-Krauel, J. Cebria, R. Diaz, J.C. Jimenez-Chillaron, Transgenerational inheritance of glucose intolerance in a mouse model of neonatal overnutrition, *Endocrinology*

151 (2010) 5617–5623. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0684>.

[262] Protein restriction during gestation and/or lactation causes adverse transgenerational effects on biometry and glucose metabolism in F1 and F2 progenies of rats - PubMed, (n.d.).  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17927565/> (accessed January 29, 2025).