



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**BENEFICIO DEL EJERCICIO EN LAS CRÍAS DESCENDIENTES DE RATAS
CON OBESIDAD EXPERIMENTAL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

CARLOS ALBERTO IBÁÑEZ CHÁVEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR: DRA. MARCIA HIRIART URDANIVIA
INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR
DRA. MARTA ALICIA MENJÍVAR IRAHETA
FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D.F., ENERO DE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

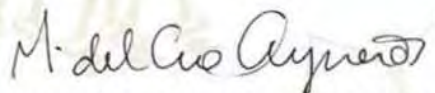
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, en su sesión ordinaria del día 11 de noviembre de 2013, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **IBÁÑEZ CHÁVEZ CARLOS ALBERTO** con número de cuenta **301018063**, con la tesis titulada **"BENEFICIO DEL EJERCICIO EN LAS CRÍAS DESCENDIENTES DE RATAS CON OBESIDAD EXPERIMENTAL"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ**:

Presidente: DRA. ANA ERIKA RODRÍGUEZ MARTÍNEZ
Vocal: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO
Secretario: DRA. MARTA ALICIA MENJÍVAR IRAHETA
Suplente: DRA. MAYEL DEL VALLE CHIRINOS ESPÍN
Suplente: DRA. MARCIA HIRIART URDANIVIA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 10 de enero de 2014



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría

A la Dra. Elena Zambrano González, la Dra. Marta Alicia Menjívar Iraheta y la Dra, Marcia Hiriart Urdanivia por sus valiosas aportaciones a este trabajo.

Agradecimientos a título personal

A Dios por estar siempre conmigo y llenarme de bendiciones cada día

A mis padres María Elena Chávez Meléndez y Rafael Ibáñez Camacho por todos sus sacrificios para que yo pueda alcanzar mis metas

A mis hermanos Ana María y José Rafael quienes han estado conmigo apoyándome en cada momento de mi vida

A Analilia Saldívar por su compañía y todo su apoyo brindado

A la Dra. Elena Zambrano González por la formación recibida

Al Dr. Fernando Larrea por el apoyo y facilidades otorgadas dentro del departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Al Dr. Antonmaria Minzoni por su amable asesoría en el análisis matemático

Al equipo de trabajo de la Dra. Elena Zambrano por el apoyo brindado y las contribuciones al presente trabajo: Dra. Guadalupe L. Rodríguez González, Dra. Claudia J. Bautista Carbajal, Dr. Luis A. Reyes Castro, Dra. Claudia C. Vega García, Dra. Consuelo Lomas Soria, Q.F.B. Fabiola Cruz, Q.F.B. Magaly Vázquez, Q.F.B. Adriana Ramírez, Q.F.B. Mariana Ramírez, Q.F.B. Abel de J. Patricio, Q.F.B. Maricela Ortiz, Nut. Margarita Lucas, Nut. Omar Saldaña, Q.A. Thalía M. Romero, Nut. Emma B. Vázquez y Nut. José L. Cortés

A mis compañeras de laboratorio M. en C. Tonantzin Sosa, M. en C. Lizbeth Calzada, Q. A. Ana L. Ortega, Q.F.B. Nancy M.V. Sánchez y Q.F.B. Mara A. Cárdenas

ÍNDICE

ABREVIACIONES	12
RESUMEN.....	13
1. INTRODUCCIÓN.....	17
1.1. Obesidad y regulación del balance energético	17
1.1.1. Tejido adiposo	18
1.1.2. Leptina.....	19
1.1.3. Insulina	20
1.2. Obesidad materna	21
1.2.1. Obesidad en el embarazo.....	21
1.2.2. Obesidad y lactancia.....	22
1.3. Orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad (DOHaD).....	22
1.3.1. DOHaD y obesidad materna.....	23
1.4. Ejercicio.....	24
2. ANTECEDENTES	26
3. JUSTIFICACIÓN	28
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	30
5. HIPÓTESIS	31
6. OBJETIVOS	32
6.1. Objetivo general.....	32
6.2. Objetivos particulares	32
7. METODOLOGÍA	33

7.1. Animales experimentales	33
7.2. Diseño experimental	34
7.2.1. Madres experimentales F0.....	34
7.2.2. Dietas experimentales.....	35
7.2.3. Crías F1	36
7.2.4. Ejercicio en rueda para roedor.....	38
7.3. Evaluación del peso corporal e ingesta.....	40
7.4. Eutanasia y disección de los animales experimentales.....	41
7.4.1. Histología del tejido adiposo	42
7.5. Química Sanguínea.....	43
7.5.1. Glucosa	44
7.5.2. Colesterol.....	44
7.5.3. Triacilglicéridos.....	45
7.6. Determinación de hormonas.....	46
7.6.1. Leptina.....	47
7.6.2. Insulina	47
7.6.3. Índice de resistencia a la insulina	47
7.7. Análisis estadístico.....	48
8. RESULTADOS.....	52
8.1. Madres experimentales F0.....	52
8.1.1. Crecimiento materno F0	52
8.1.2. Gestación y lactancia F0.....	54
8.2. Crías F1	56
8.2.1. Crías F1 durante la lactancia	56
8.2.2. Crías F1 a los 36 d	57
8.2.3. Antes de la intervención con ejercicio (a los 50 d).....	59
8.2.4. Durante la intervención con ejercicio (a los 50-110 d)	59
8.2.5. Después de la intervención con ejercicio en las crías F1 (a los 110 d)	61

9. DISCUSIÓN.....	70
10. CONCLUSIONES.....	79
11. LITERATURA CITADA	80
12. TRABAJOS RELACIONADOS	86

LISTA DE FIGURAS, TABLAS Y ECUACIONES

Figura 3.1. Distribución del estado nutricional en mujeres de 20 a 49 años de edad de 1988 a 2012 en México.	28
Figura 7.1. Línea del tiempo del tratamiento experimental materno.....	35
Figura 7.2. Línea del tiempo del tratamiento experimental de las crías.....	38
Figura 7.3. Rueda para roedor.	39
Figura 7.4. Adaptación a la rueda de ejercicio	40
Figura 8.1. Curva de crecimiento materno F0 antes de aparear.	52
Figura 8.2. Parámetros maternos F0 antes del apareamiento (120 d).....	53
Figura 8.3. Peso corporal materno F0 durante la gestación y lactancia.	54
Figura 8.4. Insulina, glucosa e IRI maternos F0 al final de la lactancia.....	55
Figura 8.5. Leptina, triacilglicéridos y colesterol maternos F0 al final de la lactancia....	55
Figura 8.6. Insulina, glucosa e índice de resistencia a la insulina (IRI) a los 36 de las Crías F1.	57
Figura 8.7. Colesterol, triacilglicéridos y leptina a los 36 d de las crías F1.....	58
Figura 8.8. Ejercicio realizado por las crías F1 de los 50 - 110 d.	60
Figura 8.9. Peso corporal e ingesta a los 110 d de las crías F1	61
Figura 8.10. Tejido adiposo, índice de adiposidad y leptina a los 110 d de las crías F1..	62
Figura 8.11. Triacilglicéridos y colesterol a los 110 d de las crías F1.	63
Figura 8.12. Insulina, glucosa e índice de resistencia a la insulina (IRI) de las crías F1 a los 110 d.	64
Figura 8.13. Tejido adiposo retroperitoneal de machos F1 de 110 d.	65
Figura 8.14. Tejido adiposo retroperitoneal de hembras F1 de 110 d.	66
Figura 8.15. Distribución del tamaño del adipocito de machos F1 de 110 d.	67
Figura 8.16. Distribución del tamaño del adipocito de hembras F1 de 110 d.....	68
Tabla 7.1. Composición nutricional de las dietas	36
Tabla 7.2. Formulación de la dieta alta en grasa	36
Tabla 7.3. Localización del tejido adiposo extraído en las crías de 110 d.	42

Tabla 8.1. Pesos y medidas morfométricas al nacimiento de las crías F1.....	56
Tabla 8.2. Actividad física de las crías F1 de los 50-110 d.....	59
Tabla 8.3. Parámetros estimados de la distribución del tamaño del adipocito.....	69
Ecuación 7.1. Ingesta de alimento por día.....	41
Ecuación 7.2. Ingesta relativa.....	41
Ecuación 7.3. Índice de adiposidad	42
Ecuación 7.4. Índice de resistencia a la insulina	47
Ecuación 7.5. Ancho de categoría	49
Ecuación 7.6. Función de densidad de probabilidad gamma	50
Ecuación 7.7. Estimador del parámetro de forma	50
Ecuación 7.8. Estimador del parámetro de escala inverso	50
Ecuación 7.9. Función gamma	51
Ecuación 7.10. Asimetría de la distribución gamma	51
Ecuación 7.11. Exceso de curtosis de la distribución gamma	51
Ecuación 7.12. Moda de la distribución gamma	51

ABREVIACIONES

4-AAP:	4-Aminoatirpirina
ADP:	Adenosín difosfato (por sus siglas en inglés)
ANOVA:	Análisis de varianza (por sus siglas en inglés)
ATP:	Adenosín trifosfato (por sus siglas en inglés)
C:	Control
C+E:	Control con intervención con ejercicio
d:	Días
DAG:	Distancia ano-genital
DHBS:	Ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenzeno sulfónico (por sus siglas en inglés)
DOHaD:	Orígenes en el desarrollo de la salud y la enfermedad (por sus siglas en inglés)
EE:	Error estándar de la media
ENN:	Encuesta Nacional de Nutrición
ENSANUT:	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
F0:	Generación parental
F1:	Primera generación filial
FDP	Función de densidad de probabilidad
HE:	Hematoxilina y eosina
IA:	Índice de adiposidad
IMC:	Índice de masa corporal
IRI	Índice de resistencia a la insulina
K:	Exceso de curtosis
NAD ⁺ :	Dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado (por sus siglas en inglés)
NADH:	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido (por sus siglas en inglés)
OM:	Obesidad materna
OM+E:	Obesidad materna con intervención con ejercicio
PBS:	Amortiguador salino de fosfatos (por sus siglas en inglés)
PEG:	Pequeño para su edad gestacional
RIA:	Radioinmunoanálisis
S:	Asimetría
UI:	Unidades internacionales
VLDL:	Lipoproteínas de muy baja densidad (por sus siglas en inglés)

RESUMEN

La obesidad materna programa negativamente la fisiología de la descendencia. Se ha demostrado con modelos experimentales que los descendientes de madres obesas presentan alteraciones metabólicas en la vida posnatal tales como dislipidemia, índice de resistencia a la insulina incrementado y mayor acumulación de grasa entre otras. Sin embargo, es necesario establecer los cambios fisiopatológicos en la descendencia relacionados a la obesidad materna y determinar si los efectos negativos de la programación del desarrollo pueden ser compensados por la intervención con ejercicio en los descendientes.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar en la descendencia de madres obesas, los efectos de un esquema de ejercicio voluntario en parámetros bioquímicos, hormonales y tisulares relacionados al metabolismo energético. Para ello, el modelo experimental empleado consistió de hembras *Wistar* (F0) alimentadas desde el destete ya sea con dieta comercial para roedor (5% de grasa): grupo Control (C) o dieta alta en grasa (25% de grasa): grupo de Obesidad Materna (OM). A los 120 días (d) de edad, las hembras F0 de ambos grupos fueron apareadas con machos no experimentales. Las crías (F1) resultantes fueron destetadas a los 21 d de edad con dieta C. De los 50 a los 110 d de edad un macho y una hembra F1 de cada camada fueron intervenidos con un esquema de ejercicio que consistió en 30 min de actividad/d 5 veces a la semana en rueda para roedor. La distancia recorrida por sesión fue registrada.

Las F1 fueron asignadas dentro de 4 grupos experimentales de acuerdo a la dieta materna y la intervención con ejercicio en las crías: 1) C, 2) OM, 3) C intervenidas con ejercicio (C+E), 4) OM intervenidas con ejercicio (OM+E).

En las F1 a los 110 d de edad el peso corporal, la química sanguínea, las concentraciones en suero de leptina e insulina, el índice de resistencia a la insulina y el índice de adiposidad (peso del tejido adiposo \times 100/ peso corporal) fueron determinados; también, el área del adipocito fue cuantificada en cortes histológicos del tejido adiposo retroperitoneal. La

distribución de frecuencia del tamaño del adipocito se modeló matemáticamente de acuerdo a la función de distribución gamma.

Durante el esquema de ejercicio, la distancia recorrida por sesión fue mayor en el OM+E que en el C+E tanto en machos como en hembras F1.

A los 110 d de edad, no hubo diferencias en el peso corporal de los grupos F1 tanto en machos como en hembras. Pero en los machos F1 los triacilglicéridos, la leptina, el índice de resistencia a la insulina y el índice de adiposidad fueron mayores en el OM que en el C; la intervención con ejercicio mejoró dichos parámetros en OM+E a excepción del índice de resistencia a la insulina. En el caso de las hembras F1 los triacilglicéridos y la leptina fueron mayores en OM y OM+E comparados con C y C+E respectivamente.

La distribución de frecuencia del tamaño del adipocito de los machos F1 mostró mayor dispersión y simetría en OM en comparación con C, también se observó menor dispersión pero mayor simetría en los grupos intervenidos C+E y OM+E que en los grupos C y OM respectivamente. En las hembras F1 se observó mayor simetría en OM en comparación con el C con dispersión similar; el grupo C+E en comparación con el C tuvo mayor simetría y menor dispersión, mientras que el OM+E en comparación con OM tuvo menor simetría pero dispersión similar.

En conclusión, el ejercicio regular resulta benéfico en los descendientes de madres obesas, al compensar parcial o totalmente algunos de los efectos fisiopatológicos por la obesidad materna asociados con el crecimiento del tejido adiposo encontrándose beneficios específicos en machos y hembras.

ABSTRACT

Maternal obesity negatively programs offspring physiology. It has been shown on experimental models that the offspring of obese mothers have metabolic alterations on postnatal life such as dyslipidemia, increased insulin resistance index and greater fat accumulation among others. However, there is a need to establish the pathophysiological changes in offspring related to maternal obesity and to determine whether developmental negative programming outcomes can be counterbalanced by offspring exercise intervention.

The objective of the present work was to evaluate in the offspring of obese mothers, the effects of a voluntary physical activity scheme on the biochemical, hormonal and tissular parameters related to energy metabolism. To achieve this, the employed experimental model consisted on fed female *Wistar* rats (F0) from weaning with whether commercial rodent diet (5% fat): Control group (C) or high fat diet (25% fat): Maternal Obesity group (OM). At 120 days (d) of age, F0 females from both groups were mated with non-experimental males. The resulting offspring (F1) were weaned at postnatal d 21 on C diet. From 50 to 110 d of age one male and one female F1 from each litter were intervened with an exercise scheme that consisted on 30 min activity/d 5 times a week on a rodent wheel. The distance covered on each session was recorded.

F1 were assigned into 4 experimental groups according to maternal diet and offspring exercise intervention: 1) C; 2) OM; 3) C exercised intervened (C+E), 4) OM exercised intervened (OM+E).

In F1 at 110 d of age body weight, blood chemistry, serum leptin and insulin concentrations, insulin resistance index and adiposity index (adipose tissue weight \times 100/body weight) were determined; adipocyte area was also quantified in histological sections from retroperitoneal adipose tissue. The frequency distribution of adipocyte size was mathematically modeled according to the gamma distribution function.

During the exercise scheme, the distance covered by session was higher in OM+E as compared to C+E in both male and female F1.

At 110 d of age, there were no differences in body weight among F1 groups in male and female. But in male F1 triacylglycerides, leptin, insulin resistance and adiposity index were higher in OM compared to C; exercise intervention recovered these parameters in OM+E with the exception of insulin resistance index. In the case of female F1 triacylglycerides and leptin, were higher in OM and OM+E compared to C and C+E respectively.

The frequency distribution of adipocyte size of male F1 showed greater dispersion and symmetry in OM compared to C; and less dispersion but greater symmetry in the intervened groups C+E and OM+E compared to C and OM respectively. In female F1 it was noted greater symmetry on OM compared to C with similar dispersion; the C+E compared to C had greater symmetry and less dispersion, while the OM+ E compared to OM had less symmetry but similar dispersion.

In conclusion, regular exercise is beneficial in the offspring of obese mothers, to partially or completely counterbalance some pathophysiological effects by maternal obesity associated with adipose tissue growth with specific benefits in males and females.

1. INTRODUCCIÓN

La obesidad es el resultado del desequilibrio entre el gasto y el aporte de energía, es decir, de ingerir más calorías en la dieta que las utilizadas en las actividades fisiológicas que consumen energía. En efecto, el aumento en la proporción de grasa y la densidad energética de la dieta junto con la disminución en el nivel de actividad física y el incremento en el nivel de comportamiento sedentario son los factores más importantes que contribuyen a la elevación en el promedio del peso corporal de las poblaciones (Méndez-Sánchez and Esquivel 2002).

Sin embargo, los conocimientos actuales sobre genética y biología molecular permiten plantear la etiopatogenia de la obesidad como un fenómeno complejo (González Jiménez 2013). En este sentido, la teoría de un aumento de la ingesta mantenido en relación un gasto energético deficiente resulta una teoría excesivamente simplista, ya que la obesidad es un trastorno muy heterogéneo en su origen, estando implicada una amplia diversidad de factores, tanto genéticos como nutricionales.

1.1. Obesidad y regulación del balance energético

En los mamíferos existe un conjunto complejo de señales hormonales y neuronales que tiene como finalidad mantener el equilibrio en la ingesta y el gasto energético, de modo que la cantidad de tejido adiposo se mantenga dentro de límites adecuados. En el sistema nervioso central se regulan muchos de los mecanismos autónomos complejos que mantienen la constancia del medio interno, integrados en el hipotálamo, donde el núcleo arcuato recibe las señales centrales y periféricas relacionadas a los almacenes energéticos (Kennedy 1953). De igual forma, cada vez hay más evidencia de una serie de mecanismos sensores que están coordinados dentro del cerebro y conllevan cambios de comportamiento en alimentación, actividad física y metabolismo corporal de manera que permiten que las reservas corporales se mantengan. Estos mecanismos están presentes en el tejido adiposo, cerebro e intestino, encargados de la detección de la llegada de nutrientes de la dieta, así

como su distribución, metabolismo y/o almacenamiento (Schwartz, Woods et al. 2000; Schwartz 2006; Ishii, Muranaka et al. 2007).

El organismo puede afrontar un exceso de calorías en la dieta de tres maneras: i) convertir el exceso calórico en grasa y almacenarla en el tejido adiposo; ii) consumir el exceso calórico mediante ejercicio adicional y iii) desviar el consumo energético hacia la producción de calor.

1.1.1. Tejido adiposo

El tejido adiposo se encuentra distribuido en distintas localizaciones en el organismo. Estos depósitos se encuentran principalmente a escala dérmica, subcutánea, mediastínica, mesentérica, perigonadal, perirrenal y retoperitoneal. De acuerdo a las diferencias en su morfología, distribución, expresión génica y función, se distinguen dos tipos: el tejido adiposo pardo el cual posee actividad termogénica y el tejido adiposo cuya principal función es almacenar energía.

La unidad funcional del tejido adiposo es el adipocito, se constituye dentro de un tipo de células especializadas que se encuentran permanentemente en la etapa G-0 del ciclo celular. Estos se originan de los pre adipocitos, que son células primitivas que se encuentran en la periferia de los vasos y generalmente se encuentran en reposo (Moreno and Martinez 2002). En el interior del adipocito las grasas se acumulan formando una gran gota central rodeada por un notablemente delgado borde de citoplasma. En preparaciones teñidas con hematoxilina y eosina (HE), el tejido adiposo puede presentar un aspecto de alambre tejido (Cormack 2001), debido al espacio vacío antes lleno de grasas que queda dentro de cada adipocito después de los lavados con diferentes alcoholes requeridos en la técnica; sin embargo, la presencia de las grasas almacenadas en los adipocitos se puede demostrar fácilmente en cortes congelados mediante el uso de colorantes de grasas.

Cuando el balance energético es positivo, el tejido adiposo blanco se incrementa. El aspecto morfológico característico de la obesidad es la hipertrofia de los adipocitos seguido de la

hiperplasia, con el consecuente aumento en la capacidad de almacenamiento de los lípidos. De hecho, se ha propuesto que los adipocitos tienen un volumen máximo al cual ya no pueden expandirse más. A este volumen máximo se le ha referido como “tamaño celular crítico” el cual es genéticamente determinado y específico para cada depósito (DiGirolamo, Fine et al. 1998). Los adipocitos que alcanzan el tamaño celular crítico pueden desencadenar un incremento en el número celular (Faust, Johnson et al. 1978). El tejido adiposo expresa numerosos factores que pueden estar implicados en la modulación de la adipogénesis como el caso de la leptina.

Los estudios *in vitro* indican que no se produce división celular en los adipocitos completamente diferenciados que están cargados con lípidos. No obstante, tales células tienen una larga vida. Además el tejido adiposo posnatal contiene adipocitos inmaduros y precursores residuales de adipocitos de los cuales se forman células adicionales, por ejemplo, como resultado de la estimulación por estrógeno (Cormack 2001).

1.1.2. Leptina

Se puede decir que después de almacenar energía, la principal función del tejido adiposo es controlar la ingesta de energía y la distribución de la misma a otros tejidos en los periodos inter digestivos (Moreno and Martinez 2002; Cinti 2005). De hecho en 1953 se postuló la teoría lipostática donde se establecía la existencia de un mecanismo de retroalimentación que inhibe el apetito e incrementa el consumo de energía cuando el peso corporal excede un cierto valor (denominado punto de ajuste); la inhibición es suprimida cuando el peso desciende por debajo de dicho punto (Kennedy 1953). Esta teoría predice que una señal procedente del tejido adiposo influiría en los centros cerebrales que controlan el apetito y la actividad metabólica y motora. El primer factor de este tipo fue descubierto en 1994 y corresponde a una proteína de 167 aminoácidos llamada leptina. Fue identificada originalmente como el producto del gen denominado OB (obeso) en ratones de laboratorio; los ratones con dos copias defectuosas de este gen (genotipo *ob/ob*) muestran el comportamiento y fisiología de animales en situación de ayuno permanente ya que muestran un apetito ilimitado (Zhang, Proenca et al. 1994). La leptina transfiere el mensaje

de que las reservas de grasa son suficientes y promueve la disminución de la ingestión de alimentos y el aumento del gasto energético, además estimula al sistema nervioso simpático aumentando la presión sanguínea, la frecuencia cardíaca y la termogénesis mediante el desacoplamiento del transporte electrónico (Zhou, Shimabukuro et al. 1997; Friedman 2002). Independientemente, en ratones se encontró un segundo gen designado DB (diabético) que tiene un papel en la regulación del apetito. Los ratones con dos copias defectuosas (*db/db*) son obesos y diabéticos. El gen DB codifica el receptor de la leptina, cuando el receptor es defectuoso se pierde la función señalizadora de la leptina. Este receptor se expresa principalmente en las neuronas del núcleo arcuato (Tartaglia, Dembski et al. 1995). Posteriormente la señal de la leptina se transduce y mediante activadores de la transcripción se estimula la expresión de genes específicos (Schwartz, Woods et al. 2000).

1.1.3. Insulina

La insulina y su sistema de señalización están implicados en mecanismos centrales y periféricos que gobiernan la ingesta, distribución, metabolismo y almacenaje de nutrientes. De tal forma que la deposición de grasa requiere de insulina, ya que la ganancia de peso corporal no puede ocurrir en presencia de deficiencia de insulina aun cuando se consuman grandes cantidades de comida; la insulina actúa sobre sus receptores localizados en el hipotálamo para inhibir la ingesta y en el núcleo arcuato para disminuir la ingesta energética e incrementar la termogénesis (Schwartz, Woods et al. 2000). Además, por mecanismos diferentes la insulina también indica a los tejidos muscular, hepático y adiposo que aumenten la conversión de glucosa en acetil-coenzima A proporcionando el material de partida para la síntesis de grasas (Schwartz, Woods et al. 2000; Porte, Baskin et al. 2005). Se dice que los humanos y animales obesos son resistentes a la insulina por que se requiere más insulina respecto a los controles sanos para mantener el nivel normal de glucosa, siendo importante este hecho porque esta resistencia se correlaciona con la cantidad de tejido adiposo visceral (Benoit, Clegg et al. 2004).

1.2. Obesidad materna

Debido a la alta prevalencia de la obesidad antes y durante el embarazo, existe interés creciente en la influencia potencialmente negativa del estado hipernutricional materno sobre la descendencia. La obesidad y la diabetes materna están asociadas con anormalidades en el metabolismo de lípidos y aminoácidos adicionalmente al metabolismo alterado de la glucosa.

1.2.1. Obesidad en el embarazo

En el contexto de la función reproductiva, el estado nutricional juega un papel muy importante. Se sabe que una nutrición adecuada que incluya cantidades adecuadas de todas las vitaminas, minerales y macronutrientes energéticos promoverá concepciones exitosas. En cuanto al feto en desarrollo, este depende solamente de la transferencia de sustratos de la madre, ya que es el único medio de nutrición en el útero (Mahan, Escott-Stump et al. 2012).

El crecimiento fetal demanda nutrientes y energía adicionales. Por otro lado la ganancia de peso corporal característico, comprende varios componentes necesarios para el crecimiento fetal y mantenimiento de la madre, que incluye órganos maternos (útero, mamas y sangre), las reservas de tejido adiposo y productos de la concepción. La mujer embarazada duplica su volumen sanguíneo, las glándulas mamarias crecen rápidamente en preparación para producción de leche y las reservas de grasa materna se incrementan. Las reservas de grasa comprenden del 30 % al 40 % del peso corporal materno (Kopp-Hoolihan, Van Loan et al. 1999). Sin embargo, mujeres con sobrepeso y obesidad tienen riesgo incrementado de presentar complicaciones en el embarazo, incluyendo diabetes mellitus gestacional, hipertensión y preeclampsia (Baeten, Bukusi et al. 2001). Asimismo, existen riesgos fetales asociados que incluyen nacimiento prematuro, macrosomía, e incluso muerte fetal. (Katsura, Wada et al. 2013).

1.2.2. Obesidad y lactancia

Después de la gestación la provisión de nutrientes continúa a través de la lactancia, para asegurar un adecuado desarrollo y crecimiento. Así, desde el embarazo, ciertas hormonas influyen significativamente en el crecimiento de los ductos y alveolos de la glándula mamaria asegurando la producción adecuada de leche.

Para la madre, la producción de leche es un proceso nutricionalmente demandante con una eficiencia del 80%, en el que se requieren 80 Kcal para producir 100 mL de leche con un valor de 75 Kcal. No obstante, las reservas energéticas acumuladas durante el embarazo, proveen de 100 a 150 Kcal/día para mantener los primeros meses de lactancia y cuando estas reservas se han terminado, es necesario que se incremente la ingesta energética materna para seguir manteniendo al infante con un nivel nutrimental adecuado, sin embargo, en el caso de las madres obesas dicho incremento no es necesario.

Por otro lado, la dieta materna modula el tipo de grasa presente en la leche, al observarse el incremento o disminución de ciertos ácidos grasos; en cambio, el contenido de colesterol en la leche no es un reflejo de su consumo en la dieta materna (Mahan, Escott-Stump et al. 2012). De esta forma la dieta materna durante la lactancia puede jugar un papel muy importante en el desarrollo del lactante.

1.3. Orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad (DOHaD)

La cantidad y calidad de la alimentación *in útero* del cigoto en desarrollo, posteriormente de feto y del neonato, emerge como una explicación para las enfermedades en la vida adulta, de acuerdo al concepto de los orígenes en el desarrollo de la salud y la enfermedad (DOHaD) por sus siglas en inglés (Nijland, Ford et al. 2008). El DOHaD constituye un campo multidisciplinario que examina cómo los factores ambientales durante la fases de plasticidad del desarrollo interactúan con las variaciones genotípicas para cambiar la capacidad del organismo para enfrentarse con su ambiente en la vida adulta (Gluckman and Hanson 2006; Solomons 2009).

El enfoque del DOHaD ha surgido como resultado de: a) estudios epidemiológicos que demuestran la asociación entre el ambiente a edades tempranas y el riesgo de enfermedades a lo largo de la vida, b) la investigación en animales experimentales que demuestran que la perturbación en el desarrollo puede producir cambios fisiopatológicos y cambios epigenéticos en los descendientes en la edad adulta y c) el trabajo teórico que une los enfoques del desarrollo, los evolucionistas y los de la historia de vida de un individuo (Knobil and Neill 2006).

1.3.1. DOHaD y obesidad materna

Múltiples estudios epidemiológicos han demostrado que la obesidad y la ganancia de peso excesiva durante el embarazo están asociados con infantes grandes para su edad gestacional (Rode, Nilas et al. 2005), quienes además del tamaño, se encuentran en riesgo incrementado de padecer obesidad en la niñez y adolescencia (Salsberry and Reagan 2007).

El mayor peso alcanzado al nacimiento en estos descendientes indudablemente puede estar asociado con un mayor índice de masa corporal en la edad adulta. El uso de modelos experimentales con animales ha proporcionado una aproximación suplementaria a los estudios epidemiológicos.

Por otra parte la información obtenida de modelos animales ha sido muy informativa para el entendimiento de las ventanas de exposición, mecanismos y propiamente de los efectos en los descendientes. Varios modelos obesogénicos, principalmente en roedores, muestran un fenotipo relativamente común de desórdenes metabólicos en la descendencia. Sin embargo la magnitud de los efectos difiere de acuerdo al periodo del reto nutricional y la composición de la dieta (Armitage, Lakasing et al. 2005).

Se ha demostrado con modelos experimentales, que la alimentación con dietas con alta densidad de energética en la madre, induce en las crías obesidad, resistencia a la insulina y a la leptina (Bayol, Simbi et al. 2005; Taylor and Poston 2007) además de esteatosis

hepática (Bruce, Cagampang et al. 2009). Incluso también ha sido evidenciado que una sobrealimentación materna leve induce adiposidad incrementada, intolerancia a la glucosa y reguladores del apetito alterados en la descendencia (Rajia, Chen et al. 2010).

1.4. Ejercicio

El gasto energético total está repartido en 3 componentes diferentes que pueden ser determinados individualmente: 1) la tasa metabólica basal, 2) el efecto térmico de la comida y 3) la actividad física (Levine 2005).

La tasa metabólica basal representa la energía mínima requerida para el mantenimiento de las funciones vitales, contribuye con 60-70% del gasto energético total para la mayoría de los individuos sedentarios y con el 50% para aquellos físicamente activos; éste componente puede estar afectado por factores étnicos, el peso corporal, la edad, la actividad física, diferentes niveles de hormonas tiroideas y sexuales e incluso factores ambientales como la temperatura.

El efecto térmico de la comida es el componente del gasto energético relacionado a la energía requerida para la digestión, absorción, uso y almacenamiento de nutrientes posterior a la ingesta alimentaria, representa del 5 al 15% del gasto energético total y varía de acuerdo al tipo de macronutrientes (Tappy 1996). Por último, el tercer componente del gasto energético es la actividad física y representa al efecto térmico del cualquier movimiento que exceda a la tasa metabólica basal. En individuos activos, la energía requerida para este componente puede corresponder a una o dos veces el gasto energético basal; mientras que en los individuos sedentarios sólo representa menos de la mitad de la tasa metabólica basal (Yates 2005).

Los combustibles que se utilizan en ejercicios anaeróbicos (por ejemplo una carrera de velocidad) son diferentes a los que se utilizan en ejercicios aeróbicos (como una carrera de larga distancia). Inicialmente el ATP proporciona la energía directamente a la miosina (la proteína responsable inmediata de convertir la energía química en movimiento), debido a

que la cantidad de ATP disponible en el músculo es pequeña, la producción de energía depende del ritmo de producción de ATP a partir de otros combustibles como la creatina fosfato la cual puede transferir un grupo fosforilo al ADP para regenerar el ATP; no obstante, la cantidad de creatina fosfato también es limitada. De hecho la creatina fosfato y el ATP solo pueden proporcionar energía para la contracción muscular intensa durante 5 o 6 segundos solamente.

La conversión de glucógeno muscular en lactato, durante la glicólisis anaerobia, puede generar mucho más ATP que la transferencia de fosforilos de la creatina pero lo hace más lentamente; no obstante, este ritmo no se podría mantener por más de 130 segundos. Por lo que a medida que aumenta la distancia de una carrera, la respiración aeróbica adquiere importancia creciente. Así la generación de ATP a partir de ácidos grasos es esencial en las carreras de larga distancia. Los ácidos grasos entran con facilidad en el músculo donde se degradan a acetil-coenzima A y luego a CO_2 (Berg, Tymoczko et al. 2012).

2. ANTECEDENTES

En modelos con animales de experimentación ha sido evidenciado que las crías descendientes de madres con obesidad experimental muestran predisposición a enfermedades metabólicas en la vida posnatal (Armitage 2005; Taylor 2007; Kirk 2009).

Recientemente en modelos experimentales con ratas, donde la obesidad materna es inducida con alimentación altamente palatable y alta en grasa o en azúcar, se ha comprobado que sus descendientes son hiperfágicos, hipertensos e intolerantes a la glucosa en la edad adulta (Samuelsson 2008), destacando un aumento en la cantidad de tejido adiposo, la concentración de leptina e insulina (Zambrano 2010). Asimismo, en primates no humanos la alimentación materna alta en grasa en la gestación, produce que las crías muestren rasgos de hígado graso no alcohólico, los cuales permanecen incluso en la etapa posnatal (Mc Curdy 2009), también se ha demostrado que la sobre-alimentación materna en la oveja gestante incrementa la adipogénesis y lipogénesis en las crías antes del nacimiento (Muhlhausler 2007). De esta forma, varios modelos animales parecen converger en un fenotipo común de la descendencia compatible con el síndrome metabólico.

Debido a que pocos estudios han abordado la posibilidad de revertir o la prevenir el fenotipo postnatal programado por la obesidad materna (Vickers and Sloboda 2012), dentro de nuestro grupo de trabajo se han llevado a cabo trabajos experimentales con ratas de laboratorio para elucidar los mecanismos por los cuales un cambio en la dieta materna o el nivel de ejercicio pueden actuar para mejorar el fenotipo materno y de la descendencia.

De esta forma, se llevó a cabo un estudio de intervención nutricional materna con ratas *Wistar* hembra alimentadas desde el destete, a los 21 d de edad, ya sea con dieta control (para el grupo Control) o con dieta alta en grasa (para el grupo de Obesidad), y a partir de los 90 d de edad, 1 mes previo al apareamiento, la mitad de las hembras del grupo de Obesidad se alimentaron con dieta control (para formar al grupo de Intervención Nutricional); a los 120 d de edad, las hembras de todos los grupos experimentales fueron

apareadas con machos no experimentales. Las crías resultantes fueron amamantadas por su respectiva madre y a los 21 d de edad fueron destetadas para ser alimentadas con dieta control; observándose a los 120 d de edad que los machos descendientes de madres obesas, tuvieron concentraciones elevadas de glucosa e insulina y mayor índice de resistencia a la insulina (IRI) en comparación con los descendientes Control; en cambio, en los descendientes del grupo de Intervención Nutricional la concentración de glucosa se recuperó totalmente, mientras que en el IRI se observó una recuperación parcial respecto a los descendientes del grupo Control (Zambrano 2010).

Asimismo en nuestro laboratorio se llevó a cabo un estudio de intervención materna con ejercicio, donde ratas *Wistar* hembra, fueron alimentadas desde el destete, a los 21 d de edad con dieta control (para el grupo control) o con dieta alta en grasa (para el grupo de obesidad), y a partir de los 90 d de edad (1 mes previo al apareamiento) y hasta el final de la gestación, la mitad de las hembras de cada grupo experimental se intervino con un esquema de ejercicio voluntario en rueda para roedor dando lugar al grupo Control Intervenido con Ejercicio y al grupo de Obesidad Materna Intervenido con Ejercicio. Con este diseño experimental, en los descendientes macho del grupo de Obesidad a los 36 d, se observó incremento en las concentraciones de triacilglicéridos y leptina, además de mayor acumulación de grasa corporal, mientras que en los descendientes del grupo de Obesidad Intervenido con Ejercicio se previno el incremento en la concentración de leptina y se previno parcialmente el incremento en la concentración de triacilglicéridos (Vega, Reyes-Castro et al. 2013).

Estos trabajos sugieren que el ejercicio puede generar efectos benéficos en las madres obesas y consecuentemente la disminución de varios efectos adversos en la progenie en respuesta a la sobrealimentación materna; sin embargo los efectos del ejercicio realizado por los descendientes de las madres obesas aún no se ha explorado dentro de este modelo (Vickers and Sloboda 2012).

3. JUSTIFICACIÓN

Frecuentemente en los adultos el Índice de Masa Corporal (IMC), calculado mediante la división del peso corporal en Kg entre el cuadrado de la estatura en m, se usa para identificar el sobrepeso con $IMC \geq 25$ y la obesidad con $IMC \geq 30$ (Shah and Braverman 2012). México está inmerso en un proceso de transición donde la población experimenta un aumento de IMC (sobrepeso y obesidad) que afecta a las zonas urbanas y rurales, a todas las edades y a las diferentes regiones, incluyendo a mujeres en edad reproductiva. Así, de 1988 a 2012 el sobrepeso en mujeres de 20 a 49 años de edad se incrementó de 25 a 35.3 % y la obesidad de 9.5 a 35.2 %. Cabe destacar que estas prevalencias se encuentran dentro de las más altas del mundo (Gutiérrez, Rivera-Dommarco et al. 2012).

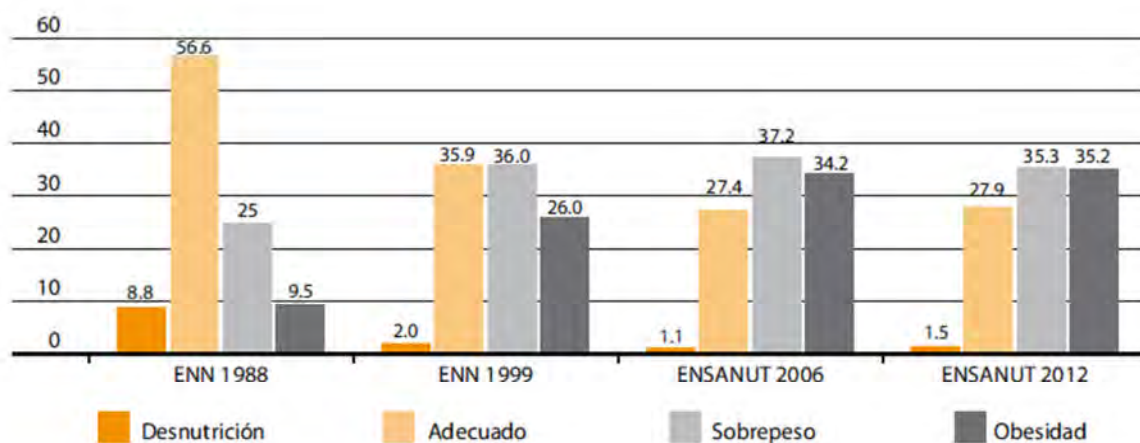


Figura 3.1. Distribución del estado nutricional en mujeres de 20 a 49 años de edad de 1988 a 2012 en México. Comparación de la Prevalencia (%) correspondiente a cada categoría del estado nutricional basada en el IMC de las participantes en la Encuesta Nacional de Nutrición (ENN) 1988, ENN 1999, Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2006 y ENSANUT 2012 (Gutiérrez, Rivera-Dommarco et al. 2012).

Tras la concepción, las mujeres con obesidad se caracterizan por tener comprometida la salud propia y la del producto (Castro 2002; Cunningham 2005). Por otra parte, es sabido que el fenotipo de un individuo no está determinado únicamente por el genotipo, sino también por el ambiente, en especial durante periodos críticos del desarrollo como la gestación y la lactancia. De esta forma, las alteraciones en el estado nutricional de la madre pueden modificar la fisiología y metabolismo de su descendencia (Wadhwa 2009).

Se ha propuesto que los niños expuestos a la obesidad materna durante el embarazo están en un riesgo elevado de presentar obesidad y diabetes mellitus tipo II, incluso se ha reportado una relación directa entre el IMC materno con la adiposidad de la descendencia (Laitinen, Power et al. 2001); de tal forma que los efectos de la sobre-nutrición *in útero* pueden ser vistos como un preocupante círculo vicioso (Dabelea and Crume 2011), por lo que es indispensable redoblar esfuerzos para disminuir estas prevalencias que están aumentando el riesgo de enfermedades crónicas no transmisibles, con grandes costos directos e indirectos para el país (Gutiérrez, Rivera-Dommarco et al. 2012).

Aunque el abordaje epidemiológico que asocia alteraciones fisiológicas en los descendientes de madres obesas a edades tempranas ha resultado bastante informativo, aún es necesario el estudio más a fondo de las consecuencias en la edad adulta. De esta forma, el abordaje experimental con modelos animales cobra gran importancia, ya que éste permite controlar mejor los factores genéticos y ambientales; asimismo, ofrecen la posibilidad de probar medidas de intervención que podrían adoptarse en la población y sobre todo contribuir a entender mejor cómo se producen los cambios fisiopatológicos en la progenie en respuesta a la sobre-alimentación materna. Además, es necesario entender cómo se produce el establecimiento de la obesidad en la progenie en respuesta a la obesidad materna; en la cual han resultado implicados numerosos factores, por ejemplo: algunos de ellos parecen ser alteraciones en la regulación de la conducta alimentaria que produce hiperfagia, una regulación inapropiada de apetito y saciedad ejercida por las hormonas leptina e insulina (Schwartz MW 2000).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Mediante el uso de modelos experimentales se ha observado en los descendientes de madres obesas diversas alteraciones metabólicas compatibles con la obesidad, independientemente de la alimentación en la vida posnatal. Si bien la obesidad es producto del desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético, resulta de suma importancia, determinar si el incremento en la actividad física en los descendientes de madres obesas, será capaz de compensar los efectos metabólicos adversos en la progenie asociados a la sobrealimentación materna.

5. HIPÓTESIS

La aplicación de un esquema de ejercicio regular en las crías descendientes de madres obesas tendrá una mejoría en el metabolismo energético mediante la reducción de la concentración de glucosa, colesterol y triacilglicéridos y así como de las hormonas leptina e insulina y. El ejercicio reducirá la acumulación excesiva de grasa resultando en la disminución del índice de adiposidad y en el tamaño promedio del adipocito.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Determinar el efecto del ejercicio en las crías descendientes de madres obesas sobre algunos parámetros bioquímicos, hormonales y tisulares relacionados con el metabolismo energético.

6.2. Objetivos particulares

- Generar obesidad experimental en ratas *Wistar* hembras F0 con dieta alta en grasa y preñarlas con un macho F0 control a los 120 d de edad.
- Determinar en las madres experimentales F0 el peso corporal e ingesta de alimento durante la gestación y la lactancia.
- En las madres F0, al final de la lactancia cuantificar en suero la concentración de las hormonas insulina y leptina así como los parámetros bioquímicos: glucosa, colesterol y triacilglicéridos
- Tomar medidas morfométricas al nacimiento en las crías F1
- En las crías F1 a los 36 d cuantificar en suero los parámetros bioquímicos: glucosa, colesterol y triacilglicéridos así como la concentración de las hormonas leptina e insulina en suero.
- Implementar y evaluar un esquema de ejercicio voluntario a partir de los 50 d hasta los 110 d en las crías F1.
- Calcular la ingesta de alimento a los 100 d a las crías F1.
- En las crías F1 a los 110 d cuantificar en suero los parámetros bioquímicos glucosa, colesterol y triacilglicéridos, así como la concentración de las hormonas leptina e insulina.
- Calcular el índice de adiposidad de las crías a los 110 d F1.

7. METODOLOGÍA

7.1. Animales experimentales

Los animales que se utilizaron para este estudio fueron ratas de la especie *Rattus norvegicus* de la cepa *Wistar* provenientes de la colonia mantenida en el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Cabe señalar que todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Investigación en Animales del mismo Instituto.

Tanto el alimento como el agua de bebida se administraron *ad libitum* y durante todo el estudio todas las ratas permanecieron en el área concedida dentro de las instalaciones del bioterio, donde se mantuvieron en condiciones de humedad relativa y temperatura controladas (75% y $22 \pm 2^\circ \text{C}$ respectivamente), con ciclos de luz/obscuridad de 12 horas.

Los animales fueron alojados en cajas estándar de acrílico (adecuadas para ratas) con una cama de aserrín de madera virgen (Northeastern Products) cambiada periódicamente. Se colocaron 3 animales por cada caja hasta antes del apareamiento, período a partir del cual sólo se colocó a una hembra por caja.

7.2. Diseño experimental

7.2.1. Madres experimentales F0

Se utilizaron hembras F0 de 21 d que fueron asignadas al Grupo Control (C) o al Grupo de Obesidad Materna (OM) de acuerdo a su patrón de alimentación, ya sea con dieta control o dieta alta en grasa, aplicado a partir del destete, durante el crecimiento, la gestación y hasta el final de la lactancia (ver detalles adelante), se emplearon 8 hembras por grupo materno.

De las hembras experimentales F0, se registró el peso corporal a lo largo del crecimiento, durante la gestación y la lactancia; asimismo, se cuantificó la concentración de glucosa, colesterol, triacilglicéridos, leptina, insulina e índice de resistencia a la insulina (IRI) antes de aparear (120 d) y al final de la lactancia (Fig. 7.1).

A fin de que se pudieran aparear, las hembras experimentales de 120 d, fueron alojadas por un periodo no mayor a tres días con un macho control de la misma cepa (alimentado con dieta control antes del apareamiento). El inicio de la preñez se determinó por medio de frotis vaginal, considerando como resultado positivo la presencia de espermatozoides en los campos observados al microscopio. Las crías F1 resultantes permanecieron en la misma caja que su madre desde el nacimiento hasta los 21 d, a fin de ser amamantadas.

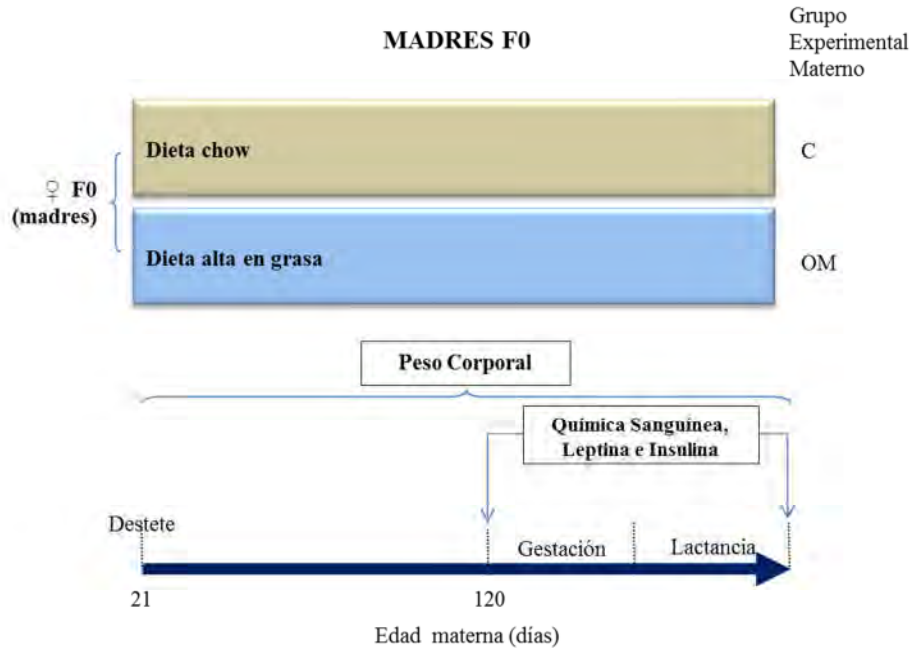


Figura 7.1. Línea del tiempo del tratamiento experimental materno. Se esquematiza la alimentación materna desde el destete hasta el fin del periodo de lactancia.

7.2.2. Dietas experimentales

La dieta control consistió en alimento comercial Chow (Purina 5001) cuyo contenido energético fue de 4 Kcal/g y la dieta alta en grasa fue preparada en el laboratorio, con manteca de cerdo al 20%_(p/p) y un contenido energético de 5 Kcal/g (Tabla 7.1 y 7.2).

Tabla 7.1. Composición nutricional de las dietas.

Nutriente	(%_o(p/p))	
	Dieta Control	Dieta Alta en Grasa
Proteína	22.0	23.4
Grasa Vegetal	5.0	5.0
Grasa Animal	0	20.0
Polisacáridos	31.0	20.59
Azúcares simples	31.0	20.59
Fibra dietética	4.0	4.42
Minerales	6.0	5.0
Vitaminas	1.0	1.0

Contenido Energético 4 Kcal /g 5 Kcal/g

Datos obtenidos del análisis garantizado por el fabricante de la dieta control y calculados a partir de la formulación de la dieta alta en grasa.

Tabla 7.2. Formulación de la dieta alta en grasa

Componente	Concentración (g/100g de Dieta)
Caseína	11.5
Caseinato de Calcio	11.5
Diclorhidrato de L-Cistina	0.3
Mezcla de Minerales AIN-76	5
Mezcla de Vitaminas AIN-93 VX	1
Clorhidrato de Colina	0.17
α -Celulosa	5
Almidón de maíz	20.4
Glucosa Anhidra	20.4
Aceite de Soya	5
Manteca de cerdo	20

7.2.3. Crías F1

Al día del nacimiento de las crías F1 provenientes de los grupos C y OM, se midió el peso corporal y se tomaron diversas medidas morfométricas, por medio de un calibrador vernier (Scala) las cuales consistieron en:

- Talla: longitud medida desde la punta de la nariz hasta la base de la cola
- Diámetro cefálico: longitud medida en la cabeza a la altura de las orejas
- Diámetro abdominal: longitud medida a la altura de la base de las costillas
- Distancia ano-genital: longitud medida entre el ano y el poro genital

También se calculó el cociente de la distancia cefálica entre la distancia abdominal (Relación Cefálica-Abdominal) de cada una de las crías correspondientes a cada camada.

Todas las crías F1, desde el nacimiento hasta los 21 d, permanecieron con su respectiva madre F0; no obstante, a los 2 d las camadas fueron ajustadas a 10 crías/madre, (en nuestro caso todas las madres parieron más de 10 crías por lo que el número excedente se eutanizó procurando dejar tanto como fuera posible el mismo número de machos que de hembras). A partir de los 21 d todas las crías F1 de todos los grupos se alimentaron con dieta control hasta el final del experimento. De los 50 a los 110 d a un macho y a una hembra F1 de cada camada se les aplicó un esquema de ejercicio voluntario (ver detalles adelante). El resto de los descendientes se conservó sin intervención alguna.

Las crías F1 se asignaron dentro de los siguientes 4 grupos experimentales (n=8/grupo):

- Crías F1 descendientes de madres C (C)
- Crías F1 descendientes de madres C e intervenidas con ejercicio (C+E)
- Crías F1 descendientes de madres OM (OM)
- Crías F1 de madres OM e intervenidas con ejercicio (OM+E)

Es importante señalar que los animales F1 asignados dentro de un mismo grupo experimental provenían de diferente camada y fueron seleccionados al azar. De tal manera que cada rata del grupo C tenía un hermano en C+E y cada rata del grupo OM tenía un hermano en OM+E.

A los 36 y 110 d se determinó la química sanguínea (determinación sérica de glucosa colesterol y triacilglicéridos), así como las hormonas insulina y leptina. A los 50 d se

determinó el peso corporal y durante el esquema de ejercicio se registró la actividad realizada en cada sesión. Hacia el final del esquema de ejercicio (de los 100-110 d) se determinó la ingesta de alimento y finalmente a los 110 d se determinó el índice de adiposidad y la medición del tamaño de los adipocitos en los cortes histológicos de tejido adiposo retroperitoneal (Fig. 7.2).

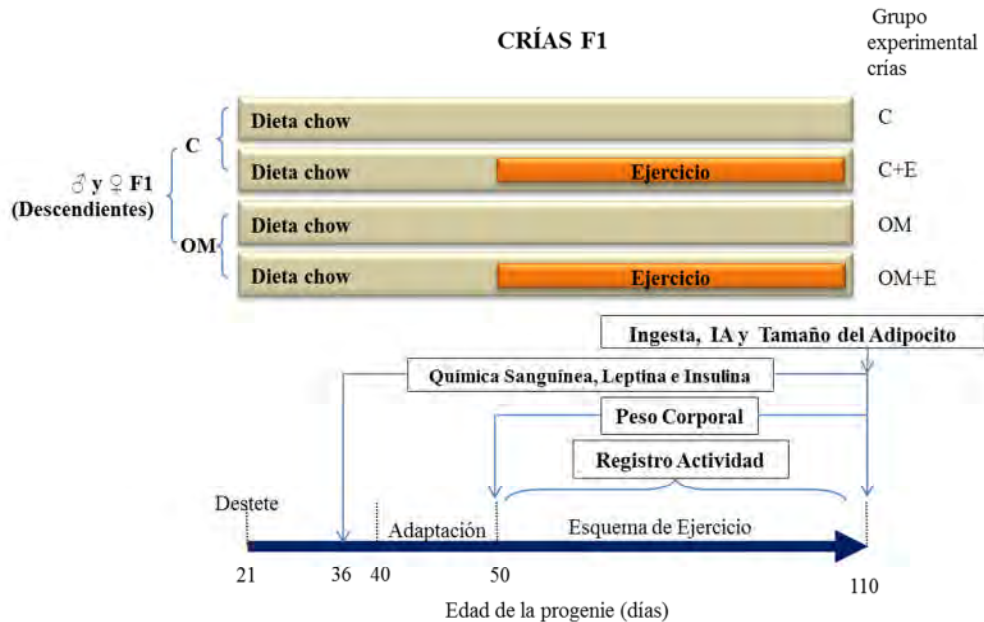


Figura 7.2. Línea del tiempo del tratamiento experimental de las crías. Se esquematiza la alimentación con dieta control de todos los grupos y el periodo de intervención con ejercicio.

7.2.4. Ejercicio en rueda para roedor

La rueda para roedor empleada consistió en 2 circunferencias paralelas de metal de 30 cm de diámetro unidas por peldaños de 10 cm de largo, soportadas por una barra diametral colocada de cada lado la cual fue ensamblada a un eje metálico que permitía el libre giro. En cada extremo de la barra diametral fue colocado un imán a fin de que pudieran registrarse el movimiento por el sensor magnético de un odómetro.

El odómetro registró media revolución por cada 2 señales magnéticas sensadas. Así cada revolución fue contabilizada como 1.885 m recorridos de acuerdo a la circunferencia de la

rueda [$\pi \times (0.3\text{m})$]. El dispositivo experimental se situó a una altura >30 cm respecto al piso (Fig. 7.3).

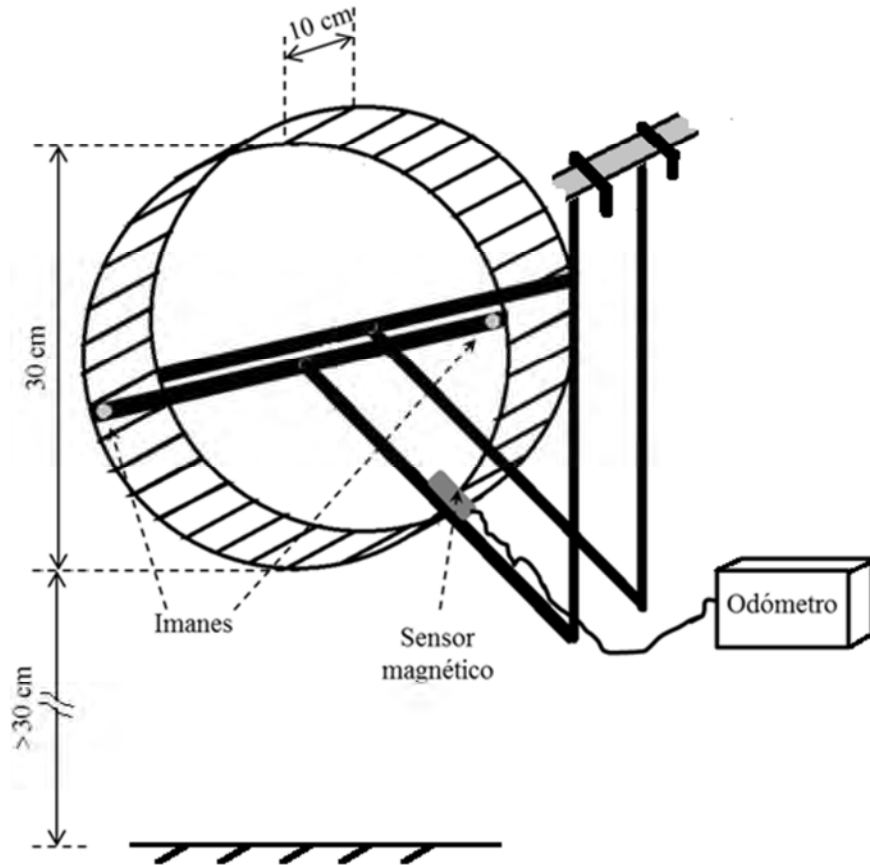


Figura 7.3. Rueda para roedor. Esquema del dispositivo experimental empleado para el esquema de ejercicio con los imanes en la barra diametral y el sensor magnético del odómetro fijado al soporte para evaluar el ejercicio realizado.

Previo a la aplicación del esquema de ejercicio a partir de los 40 d de edad de las crías experimentales, todos los grupos de crías tanto hembras como machos, se mantuvieron con un ciclo de luz/obscuridad invertido (luces apagadas 7:00-19:00 h) con la finalidad de adaptar a los animales. Asimismo, de los 40-50 d a manera de periodo de “adaptación a la rueda de ejercicio”, se llevaron a cabo cada tercer día sesiones de “capacitación” con cada una de las hembras y los machos destinados a realizar el esquema de ejercicio. Dichas sesiones consistieron en intervalos no mayores a 10 min en los cuales los animales experimentales fueron colocados en las ruedas de ejercicio. En cada sesión se procuró

lograr que los animales giraran la rueda llamando su atención cuando fuera requerido ya sea con el movimiento de dedos o algún objeto (tal como se muestra en la Fig. 7.4), o bien con un ligero impulso manual a la rueda no mayor a un cuarto de vuelta, a fin de que la rata continuara girando a la rueda por ella misma por un lapso corto. De tal forma que al momento de aplicar el esquema de ejercicio todos los animales estuvieran aptos para hacer girar la rueda por sí mismos.



Figura 7.4. Adaptación a la rueda de ejercicio. Rata en capacitación en la rueda para roedor en fase de oscuridad.

Una vez concluido el periodo de adaptación se aplicó el esquema de ejercicio planteado a partir de los 50 d y hasta los 110 d, donde a cada cría se le permitió “correr” en el interior de la rueda en una sesión de 2 lapsos de 15 min de actividad, con un lapso de 15 min de descanso entre ellos, a razón de 5 sesiones por semana a ritmo voluntario, pues a diferencia de otros esquemas de ejercicio el aplicado en el presente estudio no implicó estímulos aplicados por el dispositivo experimental ni por el experimentador para mantener a la rata en actividad (por ejemplo descargas eléctricas).

7.3. Evaluación del peso corporal e ingesta

Las pesadas se realizaron en una balanza analítica (Adam. PGW 1502e), usándola en la función de pesaje de animales para el caso del peso corporal. La determinación del peso corporal se realizó en los periodos establecidos por el diseño experimental tanto en las madres como en las crías.

En las crías la determinación de ingesta de alimento promedio se llevó a cabo colocando 3 animales del mismo grupo en una misma caja y pesando la cantidad de alimento presente en el comedero cada día a las 10:00 horas, reponiéndolo de tal manera que la cantidad de este no fuera inferior a 50 g.

El cálculo de la ingesta de alimento promedio por día se realizó de acuerdo a la Ec.7.1 reportándose como (g /d).

Ecuación 7.1. Ingesta de alimento por día

$$\text{Ingesta de alimento promedio} = \frac{Ai - Af(g)}{n}$$

Donde:

Ai =alimento inicial (g de alimento en el comedero el día anterior a la determinación)

Af =alimento final (g alimento en el comedero el día de la determinación)

n =animales en la caja durante la determinación

Para cada rata se calculó la ingesta relativa al peso corporal (Ec.6.2.), en donde la ingesta de alimento promedio por día correspondiente a cada rata (Ec.7.1) se ajustó a cada 100 g del peso corporal, reportándose como (g /d/100 g de peso corporal).

Ecuación 7.2. Ingesta relativa

$$\text{Ingesta de alimento relativa} = \frac{\text{Ingesta de alimento promedio}}{\text{Peso corporal}(g)} \times 100$$

7.4. Eutanasia y disección de los animales experimentales

De acuerdo al diseño experimental tanto las madres como las crías a la edad correspondiente fueron decapitadas en una guillotina para roedor (Thomas Scientific), con ayuno previo de 6 horas (06:00-12:00 h sólo con acceso al agua). Al momento de la decapitación se recolectó una muestra sanguínea (de aproximadamente 5 mL) de la región cervical en un tubo de ensayo de borosilicato en donde inmediatamente se centrifugó a 1300×g por 15 min a 4° C en una centrifuga refrigerada (Sorvall RT7), a fin de extraer el suero que fue almacenado en tubos de prolipropileno a -20°C, permaneciendo así por

algunos días hasta la determinación de la química sanguínea y la concentración de leptina e insulina.

Inmediatamente después de la recolección de sangre, se disecó cada animal, según el sexo (ver tabla 7.3) se extrajo el tejido adiposo de diferente localización y todos ellos fueron pesados individualmente en una balanza analítica (Sartorius BP 310S).

Tabla 7.3. Localización del tejido adiposo extraído en las crías de 110 d. Se indican cuales se extrajeron solo en hembras o solo machos.

Localización del tejido adiposo	Extraído en	
	Machos	Hembras
Retroperitoneal	✓	✓
Pancreático	✓	✓
Esternón	✓	✓
Epidídimo	✓	
Ovárico		✓
Uterino		✓

Con los datos registrados de la cantidad de tejido adiposo extraído se determinó el índice de adiposidad (IA) (Ec.7.3).

Ecuación 7.3. Índice de adiposidad

$$IA = \left(\frac{\text{Peso Total del Tejido Adiposo Extraído (g)}}{\text{Peso Corporal (g)}} \right) \times 100$$

Con éste parámetro calculado se puede hacer una mejor estimación del desarrollo del fenotipo obeso en los animales experimentales, debido a que este parámetro está estrechamente relacionado con el contenido de tejido adiposo en el cuerpo (Taylor and Phillips 1996; Kumar, Sunvold et al. 1999).

7.4.1. Histología del tejido adiposo

Inmediatamente después de la determinación del peso del tejido adiposo retroperitoneal, se seccionó una porción de aproximadamente 300 mg y se fijó con 8 mL de solución al 10% (p/v) de paraformaldehído en PBS 0.05 mM por 24 horas a 4° C, transcurrido el tiempo, el

tejido fijado se lavó tres veces y se almacenó a 4° C con PBS a 0.05 mM hasta el momento de su procesamiento. Cada porción de tejido fijado, se sometió a proceso automático de deshidratación mediante lavados sucesivos con soluciones alcohólicas de concentración creciente seguida de su preparación con xilol, en un procesador de tejidos histokinette (Sakura Tissue–Tek II 46406) para su posterior inclusión en parafina fundida (McCormick Scientific, Standard Paraplast) a 56-58 ° C.

Después de obtener el tejido en un bloque sólido, este se seccionó con un micrótopo (American Optical 820), en rebanadas finas de 5 µm de espesor que fueron adheridas a portaobjetos tratados previamente con poli-L-lisina. Los cortes montados en los portaobjetos fueron desparafinados y rehidratados para su posterior tinción con HE mediante la técnica estándar (Fischer, Jacobson et al. 2008).

Los cortes histológicos teñidos fueron observados al microscopio (Olympus BX51) con el objetivo de 10X y se tomaron micrografías digitales en formato JPEG con una cámara (Olympus DP-72) adaptada al equipo, añadiendo automáticamente una barra escaladora en la imagen digital, correspondiente a 50 µm para calibración, mediante un software diseñado para la obtención de imágenes digitales (Olympus DP2-BSW). Posteriormente una micrografía digital correspondiente a cada rata experimental fue analizada mediante un software de procesamiento de imágenes (Carl Zeiss AxioVision LE), seleccionando manualmente la región delimitada por los bordes de cada adipocito entero en la imagen cuyas áreas se cuantificaron automáticamente en µm².

7.5. Química Sanguínea

Las muestras séricas conservadas a -20° C, fueron descongeladas a temperatura ambiente durante 15 min previos al inicio del análisis.

La medición de la concentración sanguínea de glucosa, colesterol total y triacilgliceroles, así como sus muestras de control de calidad correspondientes, fueron realizadas con un sistema automatizado (Beckman-Coulter, Synchron CX 5 Delta). Este equipo empleado

utiliza un multicalibrador (Beckman-Coulter, Multi Synchron CX) y sus reactivos correspondientes diseñados para dicho sistema. Las determinaciones se llevaron a cabo con reactivos diseñados especialmente para este sistema y los parámetros antes mencionados fueron programados en el equipo, el cual realiza el análisis espectrofotométrico a partir de ensayos enzimáticos que se describen a continuación.

7.5.1. Glucosa

La concentración de glucosa se determinó por un método de punto final a tiempo fijo utilizando el reactivo comercial para determinación de glucosa (Synchron GLU 467825), compuesto por: ATP 3.8 mM, NAD^+ 2.7 mM, hexocinasa 2.0 KUI/L, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 3.0 KUI/L, además de otras sustancias no reactivas necesarias para el funcionamiento óptimo del sistema. El sistema dispensa en forma automática los volúmenes de muestra y reactivo. La proporción es 1 parte de muestra a 100 partes de reactivo.

En las reacciones dadas durante la corrida, la hexocinasa cataliza la transferencia de un grupo fosfato a partir del ATP a la glucosa formándose ADP y glucosa-6-fosfato. Luego la glucosa-6-fosfato se oxida a 6-fosfogluconolactona con la reducción concomitante de NAD^+ a NADH por la acción catalítica de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

El sistema monitoriza el cambio de absorbancia a $\lambda=340$ nm. El cambio de absorbancia es directamente proporcional a la concentración de glucosa en la muestra y es usado por el sistema para calcularla y expresarla en mg/dL.

7.5.2. Colesterol

Se utilizó un método de punto final a tiempo fijo empleando el reactivo comercial para determinación de colesterol (Synchron CHOL 467825) el cual se compone de 4-AAP 0.28 mM, fenol 8.06 mM, colesterol esterasa 211 UI/L, colesterol oxidasa 216 UI/L, peroxidasa 6667 UI/L, además de otras sustancias no reactivas necesarias para el funcionamiento

óptimo del sistema. En el sistema automatizado dispensa los volúmenes apropiados de muestra y reactivo en una cubeta, en proporción de 1 parte de muestra a 100 partes de reactivo.

En las reacciones efectuadas en el equipo, la colesterol esterasa hidroliza los ésteres de colesterol a colesterol libre y ácidos grasos, el colesterol libre es oxidado a colestén-3-ona y peróxido de hidrógeno por medio de la colesterol oxidasa, la peroxidasa cataliza la reacción del peróxido de hidrógeno con 4-AAP y fenol produciendo quinoneína, un producto de color.

Así, el sistema determina el cambio de absorbancia a $\lambda=582$ nm, ya que este es proporcional a la cantidad de colesterol en la muestra, de este modo el sistema puede calcular y expresar la concentración de colesterol en mg/dL.

7.5.3. Triacilglicéridos

Para esta determinación se utilizó un reactivo comercial para determinación de triacilglicéridos (Synchron GPO 445850), mediante un método de punto final a tiempo fijo donde el sistema dispensa automáticamente los volúmenes en proporción de 1 parte de muestra por cada 100 partes de reactivo. Este se compone de: lipasa 68 U/L, ATP 2.56 mM, glicerol cinasa 4 KUI/L, glicerofosfato oxidasa 1.1 KUI/L, 4-AAP 0.71 mM, ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenzeno sulfónico (DHBS) 1.56 mM, peróxidasa de rábano 9 KUI/L, además de otras sustancias no reactivas necesarias para el funcionamiento óptimo del sistema.

Por la adición del reactivo los triacilglicéridos de la muestra son hidrolizados a glicerol y ácidos grasos libres por medio de la lipasa dándose así una secuencia de tres pasos enzimáticos donde el glicerol es transformado por la glicerol cinasa en glicerol-3-fosfato, y este por acción de la glicerolfosfato oxidasa se transforma en dihidroxiacetona y H_2O_2 , de esta forma la peroxidasa de rábano causa el acoplamiento oxidante a partir del peróxido de

hidrógeno generado junto con el DHBS y la 4-AAP para formar un colorante rojo de quinoneína.

7.6. Determinación de hormonas

Tanto la concentración de insulina como la de leptina se determinó por radioinmunoanálisis (RIA). En dicha técnica, una concentración establecida de antígeno marcado radiactivamente es mezclada con una concentración desconocida de antígeno de la muestra (analito) e incubada con una dilución constante de antisuero de tal forma que la concentración de sitios de unión al antígeno en los anticuerpos sea limitada, (por ejemplo, cuando sólo el 50% del antígeno puede ser unido al anticuerpo).

En este tipo de sistemas debe existir competencia entre los antígenos marcados y no marcados (provenientes de la muestra), por el número limitado y constante de los sitios de unión disponibles en el antisuero. Así, la cantidad de antígeno marcado unido al anticuerpo disminuye a medida que la concentración de antígeno no marcado aumenta. Esto puede ser medido después de separar el complejo antígeno-anticuerpo formado del antígeno marcado libre (por ejemplo mediante inmunoprecipitación), midiendo la radiactividad ya sea de una u otra fracción o bien de ambas, pudiéndose establecer una curva patrón con una serie de estándares que incrementen su concentración de antígeno no marcado y a partir de ésta curva, la cantidad desconocida de antígeno en la muestras puede ser calculada (Lehninger, Nelson et al. 2008).

Las muestras de suero conservadas a -20°C , fueron descongeladas a temperatura ambiente durante 15 min antes de poner una cantidad de 100 μL de muestra en tubos de boro-silicato para centelleo según el protocolo de la determinación con el estuche correspondiente.

7.6.1. Leptina

Se utilizó un estuche de RIA para leptina de rata (LINCO RL-83K), el cual utiliza leptina de rata marcada con el isótopo radiactivo ^{125}I y un antisuero específico para leptina de rata con una sensibilidad de 0.5 ng/mL.

7.6.2. Insulina

Asimismo, se utilizó un estuche de RIA para insulina de rata (LINCO RI-13K), en el cual se emplea insulina de rata marcada con el isótopo radiactivo ^{125}I y un antisuero específico para leptina de rata con una sensibilidad de 0.1 ng/mL. Cabe señalar que cada estuche contiene sus propios estándares de leptina e insulina con los cuales se elaboró la curva patrón. Para ambas determinaciones, se usó un contador de radiaciones γ (Packard Instruments).

7.6.3. Índice de resistencia a la insulina

El índice de resistencia a la insulina (IRI) se determinó de acuerdo la Ec. 7.4, utilizando los factores de conversión 1/18 y 25 para adecuar la concentración de glucosa obtenida en mg/dL y de insulina en ng/mL al modelo de análisis homeostático (HOMA por sus siglas en inglés), en donde el producto de la glucosa en mM y la insulina en mUI/L es dividido por 22.5 (Matthews, Hosker et al. 1985).

Ecuación 7.4. Índice de resistencia a la insulina

$$IRI = \frac{\frac{(Glucosa \text{ (mg/dL)})}{18} \times (Insulina \text{ (ng/mL)}) \times 25}{22.5}$$

7.7. Análisis estadístico

El análisis de los parámetros maternos, así como de los diferentes parámetros correspondientes a las crías hasta los 50 d consistió en la comparación de los efectos de la alimentación materna, empleándose la prueba *t-Student* a fin de comparar los grupos experimentales C y OM.

En el caso del esquema de ejercicio se tomó en cuenta la distancia recorrida promedio por sesión. Primero se analizó todo el esquema, de los 50 a los 110 d, comparándolos grupos C+E vs OM+E por *t-Student*. Posteriormente, con la finalidad de identificar posibles diferencias en el ejercicio durante el transcurso del esquema de ejercicio, éste se dividió en dos periodos, el primero incluyó los datos obtenidos de los 50 a los 80 d y el segundo los obtenidos de los 81-110 d, en este caso se llevó a cabo Análisis de Varianza (ANOVA por sus abreviación en inglés) de dos vías considerando al grupo experimental y periodo de ejercicio como los factores correspondientes.

Con el fin de analizar los diversos parámetros de los descendientes (correspondientes a los cuatro grupos experimentales) después de los 110 d, se llevó a cabo el ANOVA de dos vías, en donde la alimentación materna y el esquema de ejercicio fueron considerados como factores correspondientes al análisis.

Los datos se expresan como la media aritmética \pm el error estándar de la media (EE). Se empleó la prueba de comparación múltiple de Tukey en el ANOVA. En todos los casos, se consideró diferencia significativa con $P < 0.05$.

Con la finalidad de tener una visión general de la distribución del tamaño de los adipocitos de las crías, se construyó un histograma de frecuencias relativas para cada grupo utilizando en conjunto todos los datos de área obtenidos. Los datos se agruparon desde el origen en categorías correspondientes a intervalos de $500 \mu\text{m}^2$ en el caso de los machos y de $200 \mu\text{m}^2$ en el caso de las hembras. El ancho de categoría w (Ec. 7.5) se definió por aproximación a múltiplos de 100 el cociente del recorrido estadístico del área del adipocito del grupo C (*Valor*

máximo-Valor mínimo) entre el número de clases determinado en función del número de datos empleados (n) de acuerdo a la regla de Sturges ($1 + \log_2 n$) (Sturges 1926).

Ecuación 7.5. Ancho de categoría

$$w \approx \frac{\text{Valor Máximo} - \text{Valor Mínimo}}{1 + \log_2 n}$$

En el caso del tamaño del adipocito, los datos no se pudieron modelar con la distribución normal. Debido a que los adipocitos adoptan una configuración poliédrica cuando están agrupados en el tejido adiposo, al momento de ser analizados en dos dimensiones tienen un aspecto reticular característico en el que se observan celdas delimitadas por polígonos correspondientes a cada célula. El aspecto reticular de los cortes del tejido adiposo sugiere diagrama de Poisson-Voronoi; el cual es un caso particular de la división del espacio en dos dimensiones, donde dado un número de centros distribuidos al azar, el plano es dividido de acuerdo a sus áreas de influencia y así cada celda contiene todos los puntos más cercanos a su centro de origen (Tanemura 2003).

Los diagramas de Poisson-Voronoi son especialmente importantes para modelar y describir una amplia variedad de fenómenos naturales y sociales. Se ha propuesto que la distribución de tamaño de las celdas de Poisson-Voronoi se ajusta a la función de densidad de probabilidad gamma (Ferenc and Néda 2007). De esta manera se puede modelar la frecuencia relativa del área del adipocito como función del área del adipocito mediante la distribución gamma.

La FDP gamma (Ec.7.6) consta de un parámetro de forma (a), relacionado directamente con la asimetría en la agrupación de los datos y otro parámetro de escala inverso (b), relacionado inversamente con la dispersión de la distribución (ver detalles adelante)(Panik 2005).

Ecuación 7.6. Función de densidad de probabilidad gamma

$$f(x) = \frac{b^a}{\Gamma(a)} x^{a-1} e^{-bx}$$

Donde:

$f(x)$ = Frecuencia Relativa

x = Área del adipocito

a = Parámetro de forma

b = Parámetro de escala inverso

$\Gamma(a)$ = Función gamma

$e = 2.71828 \dots$ = Base de los logaritmos naturales

Los parámetros de forma (a) y de escala inverso (b) se obtuvieron estimadores por el método de los momentos (Ecs. 7.7 y 7.8) (Panik 2005), los cuales permiten utilizar el total de los datos del área de los adipocitos obtenidos en cada grupo.

Ecuación 7.7. Estimador del parámetro de forma

$$\hat{a} = \frac{n\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Ecuación 7.8. Estimador del parámetro de escala inverso

$$\hat{b} = \frac{n\bar{x}}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Dónde:

n = Número de adipocitos medidos

\bar{x} = Área promedio del adipocito

x_i = Área del i -ésimo adipocito

La función gamma (Ec. 7.9) aparece en el denominador de la FDP gamma (Ec.7.6) y es una integral definida.

Ecuación 7.9. Función gamma

$$\Gamma(a) = \int_0^{\infty} t^{a-1} e^{-t} dt$$

Donde:

t = Variable real

$e = 2.71828 \dots =$ Base de los logaritmos naturales

Con los parámetros estimados se construyó la función de densidad de probabilidad para cada grupo y se realizó la prueba de bondad de ajuste por χ^2 al histograma correspondiente.

Asimismo, el parámetro de forma se utilizó para determinar la asimetría (S) (Ec.7.10) y curtosis (K) (Ec.7.11) y los parámetros a y b para determinar la moda (Ec. 7.12) a fin de poder analizar mejor la distribución en cada grupo (Mendenhall, Wackerly et al. 1990; Panik 2005).

Ecuación 7.10. Asimetría de la distribución gamma

$$S = \frac{2}{\sqrt{a}}$$

Ecuación 7.11. Exceso de curtosis de la distribución gamma

$$K = \frac{6}{a}$$

Ecuación 7.12. Moda de la distribución gamma

$$Moda = \frac{(a - 1)}{b}$$

8. RESULTADOS

8.1. Madres experimentales F0

8.1.1. Crecimiento materno F0

8.1.1.1. Crecimiento materno F0 antes de aparear

El peso de las madres experimentales fue registrado semanalmente, previo al apareamiento y se detectó que el grupo OM tuvo una mayor ganancia de peso respecto al C a partir de los 90 d hasta el día del inicio del periodo de apareamiento (Fig 8.1).

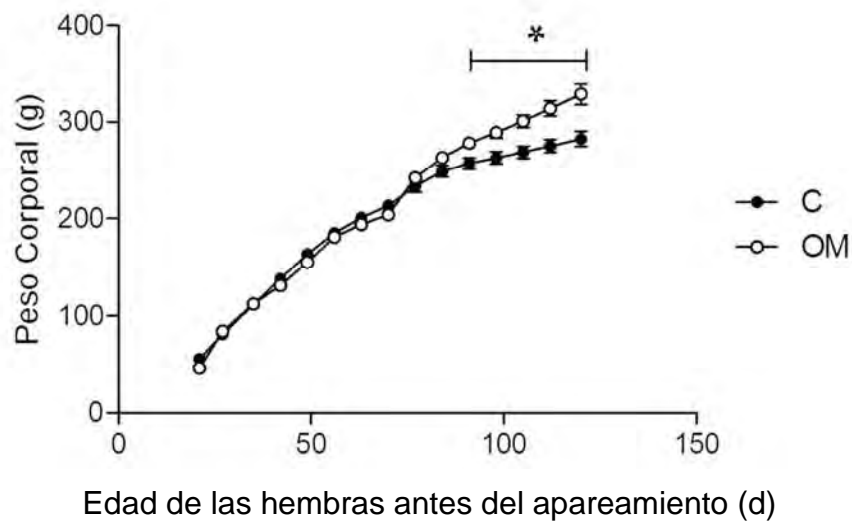


Figura 8.1. Curva de crecimiento materno F0 antes de aparear. Peso corporal materno medido semanalmente de los 21 a los 120 d. Hembras Control (C) Hembras del grupo de Obesidad Materna (OM). Media \pm EE, n=8, * vs C (P<0.05).

8.1.1.2. Parámetros bioquímicos y hormonales maternos F0 al apareamiento

A los 120 d (antes del apareamiento), en las hembras experimentales se midieron algunos parámetros hormonales y bioquímicos. En cuanto a los parámetros asociados al metabolismo de la glucosa, se encontró una elevación estadísticamente significativa en la concentración sérica de insulina, glucosa y el IRI en el grupo OM. Por lo que respecta a los parámetros asociados al metabolismo de lípidos, se detectó que la concentración sérica de leptina y triacilglicéridos fue mayor en el grupo OM, no encontrándose diferencias entre grupos en la concentración de colesterol (Fig.8.2).

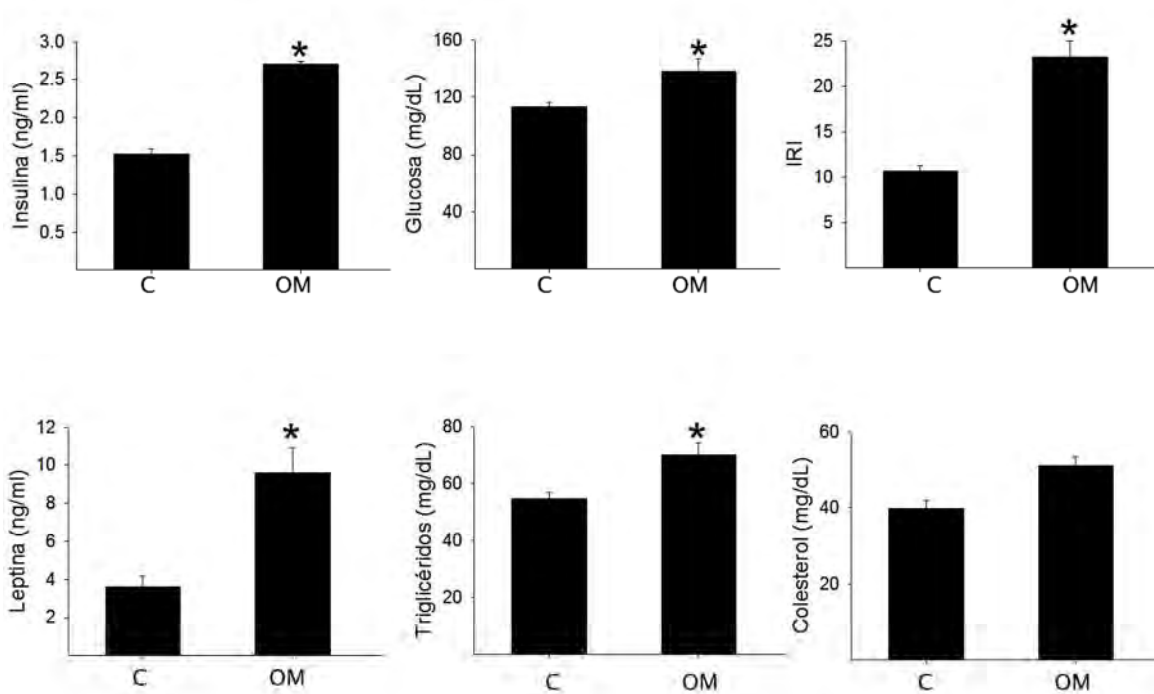


Figura 8.2. Parámetros maternos F0 antes del apareamiento (120 d). Concentraciones séricas de insulina, glucosa, índice de resistencia a la insulina (IRI), leptina, triacilglicéridos y colesterol. Media ± EE, n=8, * (P<0.05).

8.1.2. Gestación y lactancia F0

8.1.2.1. Ganancia de peso corporal materno F0 en la gestación y lactancia

Durante el periodo de gestación, el peso corporal del grupo OM fue mayor respecto al C hasta el 17 d, sin embargo, hacia el día del parto los dos grupos experimentales, mostraron el mismo peso corporal promedio. Por otro lado, el grupo OM durante los primeros 3 d de lactancia pesaron mas que el C con diferencia significativa y en el resto de la lactancia, el peso corporal materno en ambos grupos no fue diferente estadísticamente hasta el final de este periodo (21 d), (Fig. 8.3).

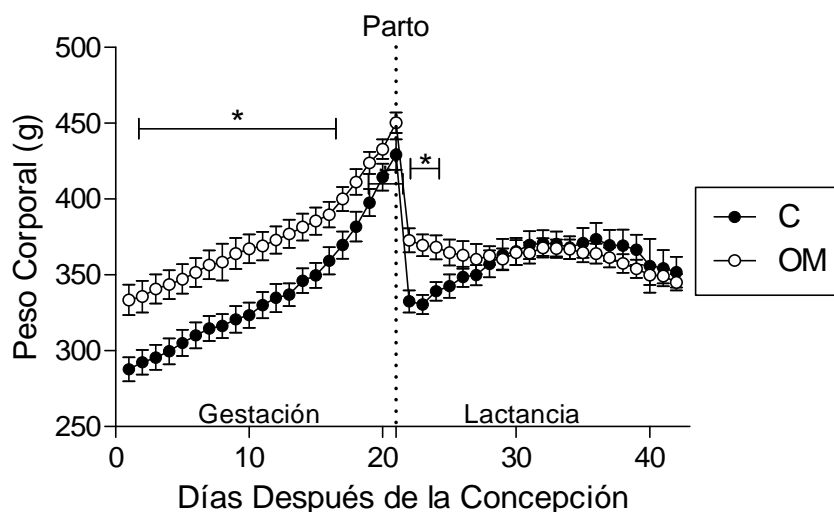


Figura 8.3. Peso corporal materno F0 durante la gestación y lactancia. Peso corporal materno medido diariamente durante la gestación y lactancia de las madres del grupo C y madres del grupo MO. Media \pm EE, n=8, * (P<0.05).

8.1.2.2. Glucosa e insulina maternas F0 al final de la lactancia

Al final de la lactancia se observó que las madres del grupo OM tuvieron concentraciones más elevadas de insulina, glucosa e IRI respecto al C (Fig.8.4).

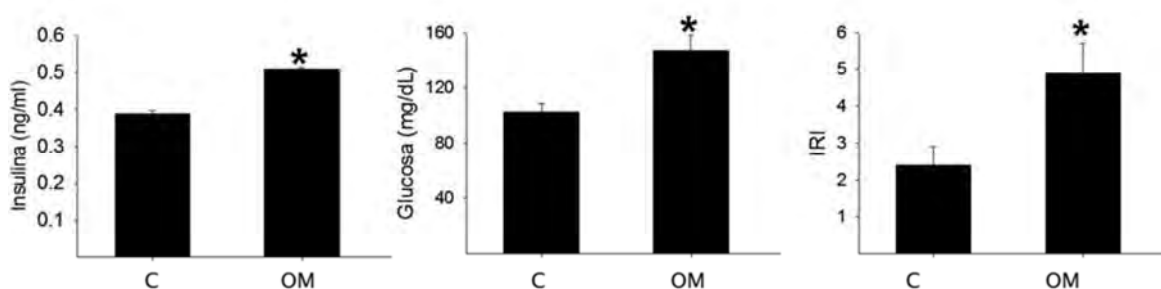


Figura 8.4. Insulina, glucosa e IRI maternos F0 al final de la lactancia. Concentración en suero a los 21 de lactancia de las madres del C y OM. Media ± EE, n=8, *(P<0.05) vs C

8.1.2.3. Colesterol, triacilglicéridos y leptina maternos F0 al final de la lactancia

Asimismo, la concentración en suero de leptina y triacilglicéridos se encontraron elevados en el grupo OM respecto a C (Fig. 8.5).

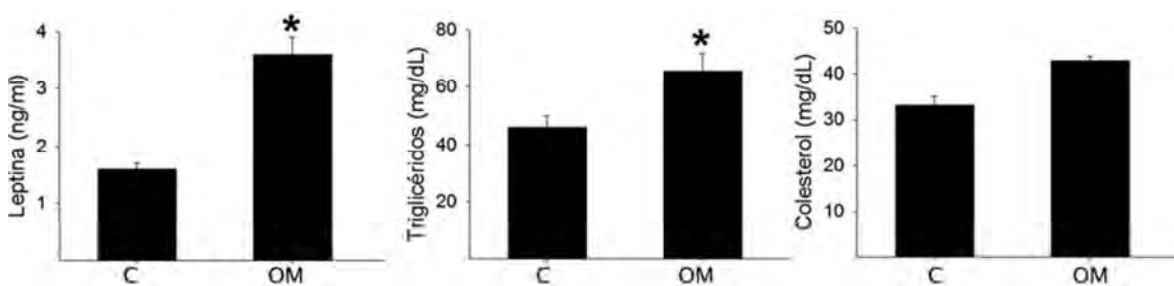


Figura 8.5. Leptina, triacilglicéridos y colesterol maternos F0 al final de la lactancia. Concentración en suero a los 21 d de lactancia de las madres del grupo C y madres del grupo OM. Media ± EE, n=8, *(P<0.05).

8.2. Crías F1

8.2.1. Crías F1 durante la lactancia

8.2.1.1. Medidas morfométricas al nacimiento de las crías F1

De las mediciones de las crías obtenidas al nacimiento, se observó un menor peso corporal con diferencia significativa en los machos del grupo OM, mientras que en las hembras no se detectó diferencia alguna. En el caso de las medidas morfométricas sólo se detectó que la DAG en los machos fue menor en el grupo OM respecto al C. Además El cociente DAG/peso corporal también fue menor (Tabla 8.1).

Tabla 8.1. Pesos y medidas morfométricas al nacimiento de las crías F1. Mediciones realizadas a las crías hembras y machos el día de su nacimiento. Se representa la Media \pm EE del valor obtenido en cada camada, n=8 camadas, * (P<0.05).

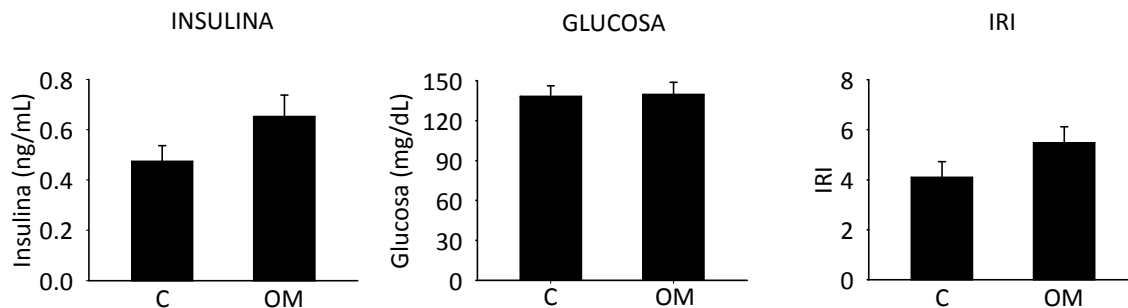
GRUPO	MACHOS		HEMBRAS	
	C	OM	C	OM
Peso (g)	5.6 \pm 0.04	5.4 \pm 0.07*	5.6 \pm 0.06	5.5 \pm 0.06
Talla (cm)	5.1 \pm 0.2	4.7 \pm 0.2	5.0 \pm 0.2	4.8 \pm 0.1
Diámetro cefálico (mm)	10.5 \pm 0.1	10.7 \pm 0.2	10.4 \pm 0.1	10.7 \pm 0.1
Diámetro abdominal (mm)	12.2 \pm 0.2	12.3 \pm 0.2	12.4 \pm 0.3	12.0 \pm 0.2
Relación diámetro cefálico: abdominal	0.85 \pm 0.02	0.86 \pm 0.02	0.88 \pm 0.04	0.88 \pm 0.05
Distancia aogenital (DAG) (mm)	3.9 \pm 0.1	3.2 \pm 0.1*	2.2 \pm 0.2	1.9 \pm 0.1
DAG/Peso (mm/g)	0.7 \pm 0.03	0.6 \pm 0.02*	0.4 \pm 0.03	0.3 \pm 0.02

8.2.2. Crías F1 a los 36 d

8.2.2.1. Insulina, glucosa e índice de resistencia a la insulina

En las determinaciones de insulina, glucosa e IRI de las crías F1 a los 36 d, no se detectaron diferencias en los machos; sin embargo, las hembras presentaron mayor concentración de insulina e IRI en el grupo OM respecto al C (Fig. 8.6).

Machos



Hembras

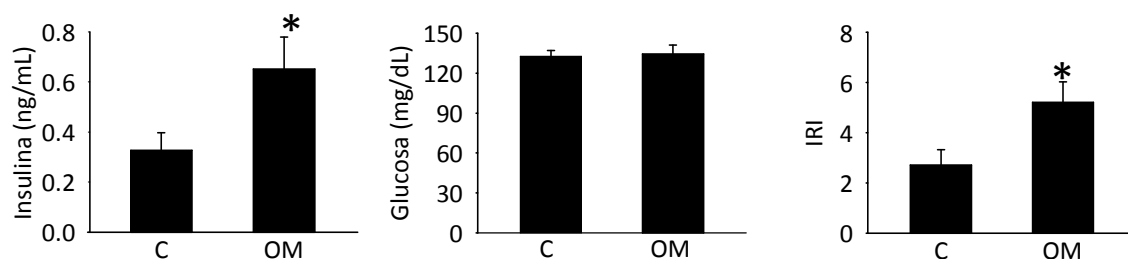


Figura 8.6. Insulina, glucosa e índice de resistencia a la insulina (IRI) a los 36 de las Crías F1. Concentraciones determinadas en las crías descendientes de las madres de los grupos C y OM. Media \pm EE, n=8, * (P<0.05).

8.2.2.2. Colesterol, triacilglicéridos y leptina

En las crías F1 a los 36 d no se detectaron cambios en las concentraciones de colesterol en hembras ni en machos. No obstante la concentración de triacilglicéridos y leptina fue mayor en machos OM respecto al C; en las hembras no hubo diferencias significativas (Fig. 8.7).

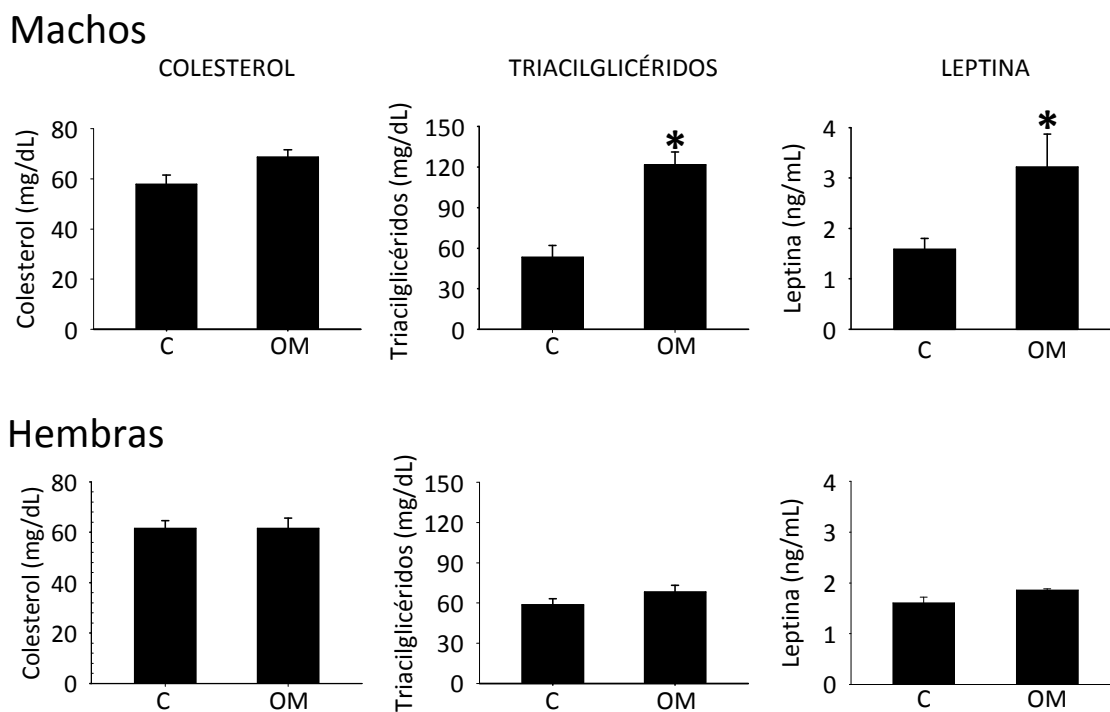


Figura 8.7. Colesterol, triacilglicéridos y leptina a los 36 d de las crías F1. Concentraciones en suero determinadas en las crías descendientes de madres de los grupos C y OM. Media \pm EE, n=8, * (P<0.05) vs C.

8.2.3. Antes de la intervención con ejercicio (a los 50 d)

8.2.3.1. Peso corporal

Antes del inicio del esquema de ejercicio se midió el peso corporal de las hembras y los machos correspondientes a los dos grupos experimentales. A pesar de que las crías experimentales provenían de madres con diferente tipo de la alimentación, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en las crías de cada uno de los grupos (datos no mostrados).

8.2.4. Durante la intervención con ejercicio (a los 50-110 d)

8.2.4.1. Ejercicio realizado

Respecto a la actividad física, registrada para cada animal como metros recorridos en cada sesión de 30 min, independientemente del grupo experimental, se observó que las hembras registraron mayor distancia que los machos (Tabla 8.2). Asimismo, se encontró que tanto en machos como en hembras, las crías del grupo OM+E en promedio recorrieron mayor distancia por sesión con una diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo C (Fig. 8.8).

Tabla 8.2. Actividad física de las crías F1 de los 50-110 d. Se representa la Media \pm EE del valor obtenido en cada grupo, n=8. * (P<0.05) vs C. en cada sexo

Grupo	Actividad Registrada (m/30min)	
	C+E	OM+E
Machos	153 \pm 5	174 \pm 7*
Hembras	279 \pm 13	382 \pm 16*

Al analizar el ejercicio realizado a lo largo del experimento se observó que en los machos C+E no hubo cambios en la distancia recorrida por sesión durante al primera y segunda mitad del esquema de ejercicio, en cambio, la distancia recorrida por el grupo OM+E durante la segunda mitad del esquema fue mayor que la primer mitad y también fue mayor respecto a la distancia recorrida por el C+E durante el mismo periodo de ejercicio. En el caso de las hembras tanto del grupo C como del OM, la distancia recorrida por sesión fue mayor en la segunda mitad. Asimismo la distancia recorrida por el grupo C+E en la primera y segunda mitad del esquema fue mayor en el grupo OM+E (Fig. 8.8).

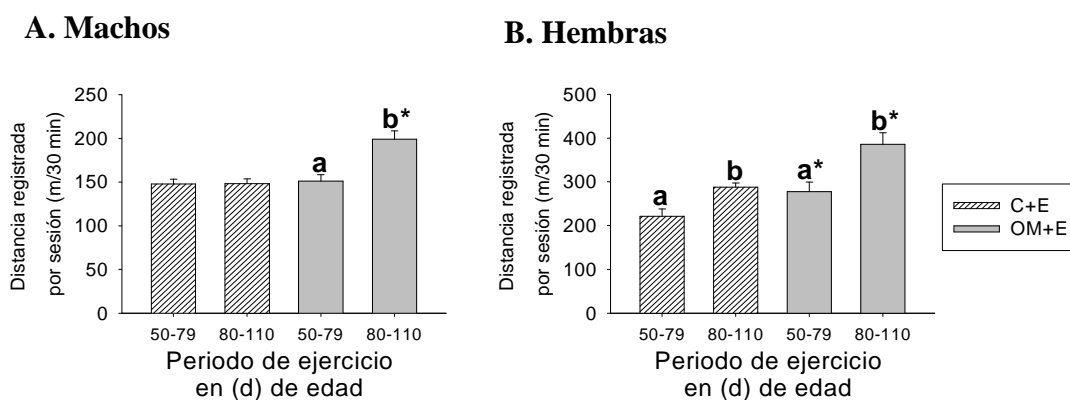


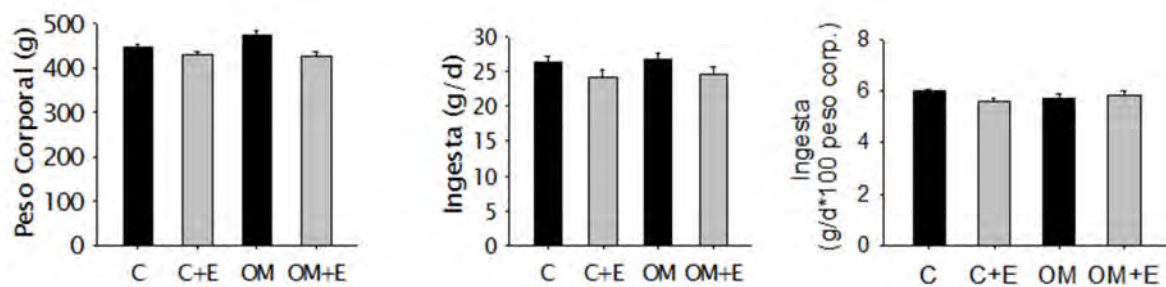
Figura 8.8. Ejercicio realizado por las crías F1 de los 50 - 110 d. Distancia total recorrida por sesión. Letras diferentes denotan diferencia entre periodos de ejercicio dentro del mismo grupo experimental, (*) denota diferencia entre grupos experimentales dentro del mismo periodo de ejercicio. Media \pm EE, n=8 (P<0.05).

8.2.5. Después de la intervención con ejercicio en las crías F1 (a los 110 d)

8.2.5.1. Peso corporal e ingesta

No se registraron diferencias significativas en el peso corporal a los 110 d en los diferentes grupos respecto al C; de igual manera no se detectaron diferencias significativas para el caso de la ingesta diaria de alimento por rata ajustada al peso corporal (Fig. 8.9).

A. Machos



B. Hembras

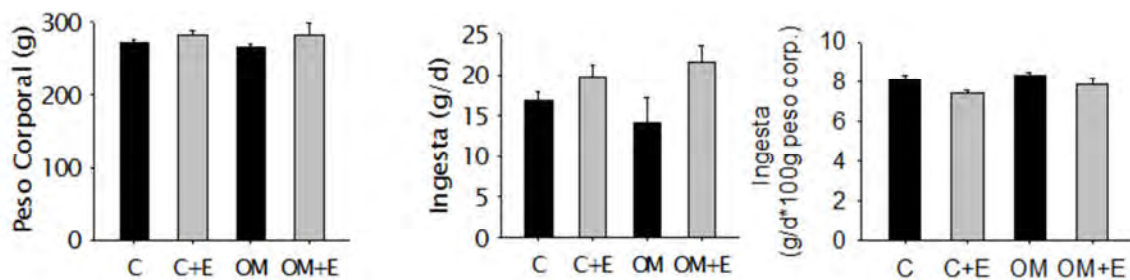
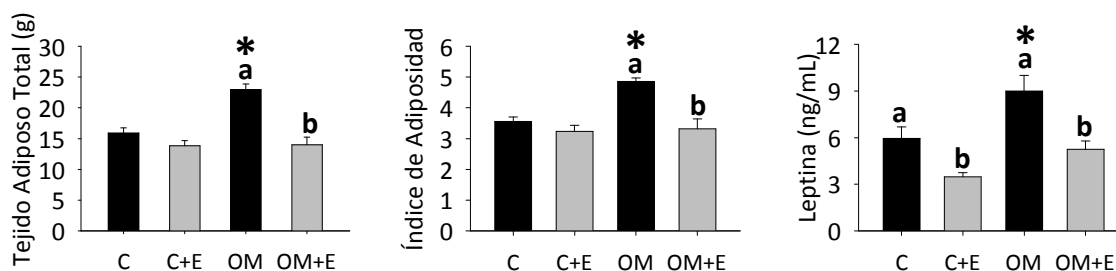


Figura 8.9. Peso corporal e ingesta a los 110 d de las crías F1. Se midió el peso corporal y se determinó la ingesta absoluta y la ingesta relativa por cada 100g de peso en machos y hembras. Media \pm EE, n=8.

8.2.5.2. Índice de adiposidad, leptina, triacilglicéridos y colesterol

Tanto el tejido adiposo total como el IA en los machos fue más elevado en el grupo OM respecto al grupo C, mientras que en los grupos intervenidos se observaron valores similares a los del C; en la hembras no se detectaron diferencias con respecto a l IA. En cuanto a la determinación de leptina, en ambos sexos fue posible identificar un aumento significativo en la concentración el grupo OM respecto al C, sin embargo, sólo los machos del grupo OM+E mostraron recuperación en este parámetro al mostrar valores estadísticamente iguales a los del C (Fig. 8.10).

A. Machos



B. Hembras

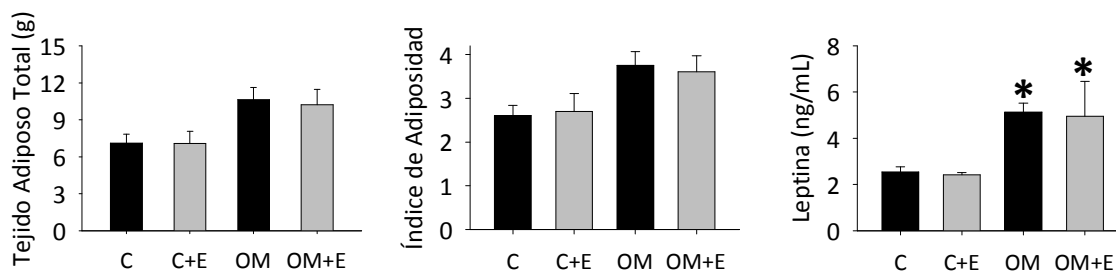
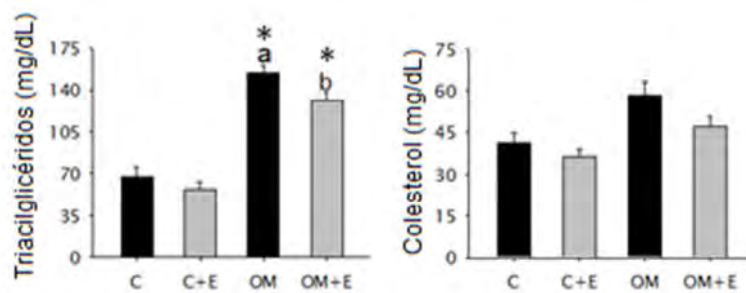


Figura 8.10. Tejido adiposo, índice de adiposidad y leptina a los 110 d de las crías F1. Parámetros medidos en machos y hembras. Media \pm EE, n=8. (*) Denota diferencia entre grupos con diferente alimentación materna y mismo esquema de ejercicio y letras diferentes para grupos con diferente esquema de ejercicio y mismo tipo de alimentación materna (P<0.05).

En cuanto a la concentración de triacilglicéridos, los machos OM mostraron un incremento respecto al C y una recuperación parcial en este parámetro en el grupo intervenido OM + E, al mostrar un valor menor que OM, pero mayor que C + E. En el caso de las hembras, este parámetro fue mayor en OM y OM +E comparado con C y C+E respectivamente. Respecto al colesterol no se observaron cambios en hembras y en machos (Fig. 8..

A. Machos



B. Hembras

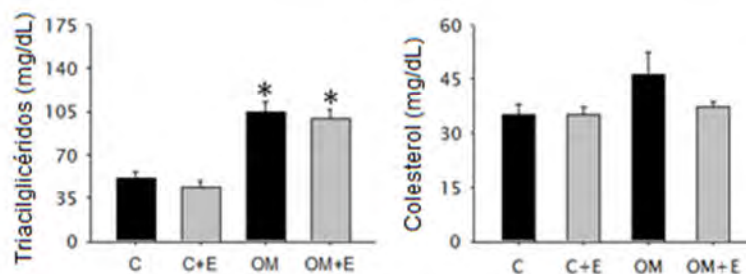
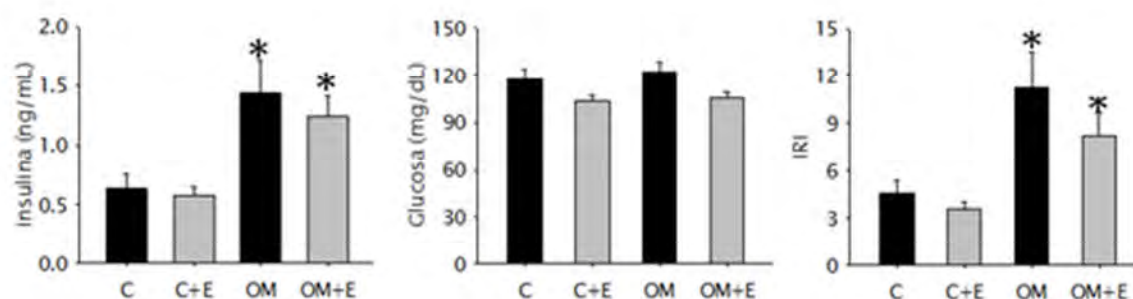


Figura 8.11. Triacilglicéridos y colesterol a los 110 d de las crías F1. Parámetros medidos en machos y hembras Media \pm EE, n=8. (*) Denota diferencias entre grupos con diferente alimentación materna y mismo esquema de ejercicio y letras diferentes para grupos con diferente esquema de ejercicio y mismo tipo de alimentación materna (P<0.05).

8.2.5.3. Insulina, glucosa e IRI

De acuerdo a los valores obtenidos en los machos respecto a la concentración sérica de insulina, se observó que esta fue mayor tanto en el grupo OM y OM+E respecto a los grupos C y C+E, por lo que se puede decir que no hubo recuperación en este parámetro. En cuanto a la concentración de glucosa en suero, se detectó un incremento en el IRI en los grupos OM y OM+E respecto a los grupos C y C+E, denotando recuperación nula en este parámetro por la intervención con ejercicio. Las hembras no denotaron diferencias significativas entre grupos en cuanto a la glucosa, insulina o el IRI (Fig.8.12).

A. Machos



B. Hembras

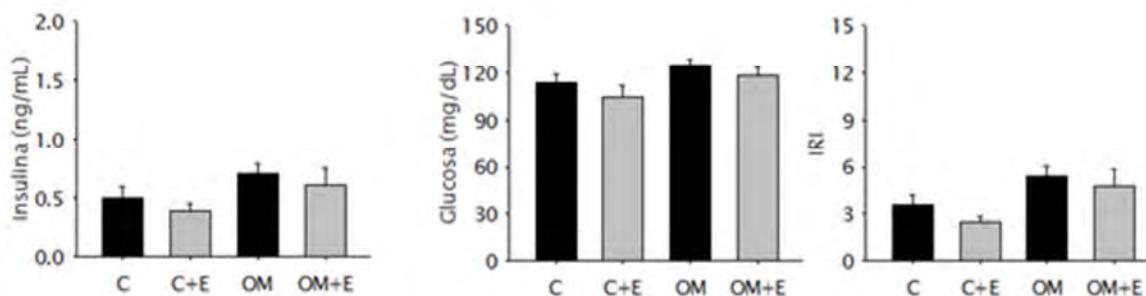


Figura 8.12. Insulina, glucosa e índice de resistencia a la insulina (IRI) de las crías F1 a los 110 d. Parámetros medidos en machos y hembras. Media \pm EE, n=8. (*) Denota diferencias entre grupos con diferente alimentación materna y mismo esquema de ejercicio y letras diferentes para grupos con diferente esquema de ejercicio y mismo tipo de alimentación materna (P<0.05).

8.2.5.4. Tamaño del adipocito

Partiendo de las imágenes digitales tomadas de los cortes histológicos del tejido adiposo retroperitoneal teñidos por HE (Fig. 8.13 y 8.14), se determinó el área de cada adipocito y se analizó su distribución de frecuencias.

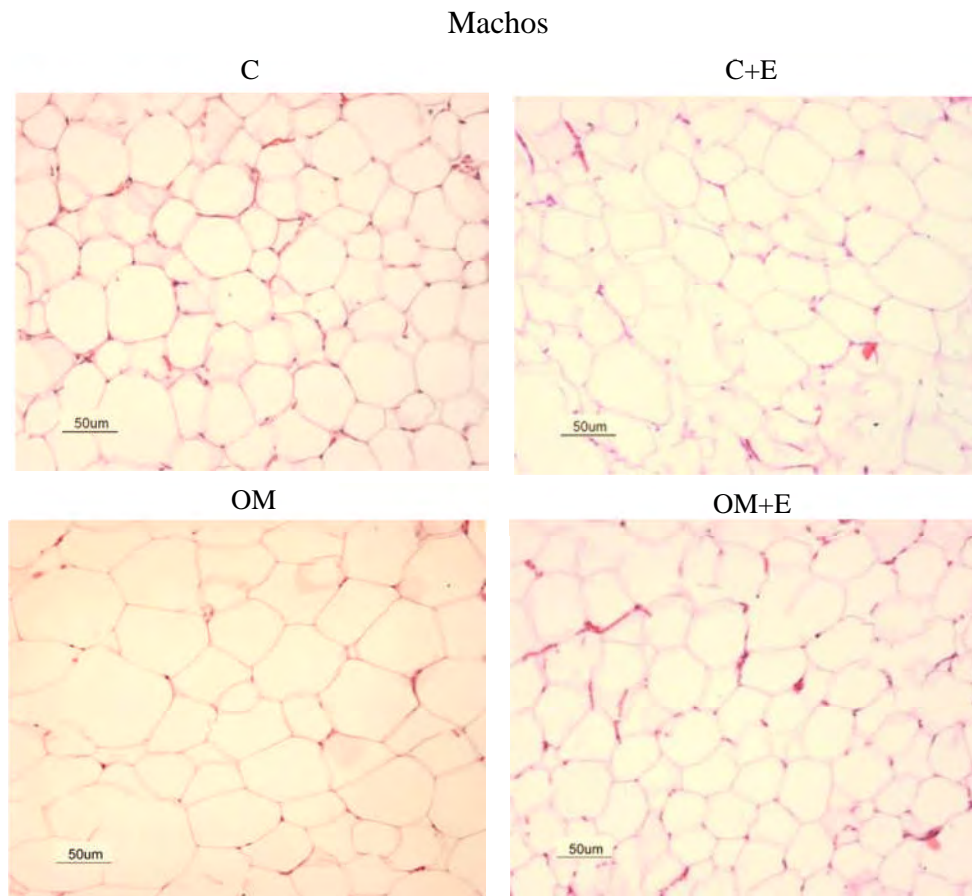


Figura 8.13. Tejido adiposo retroperitoneal de machos F1 de 110 d. Cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina observados a 50X correspondientes a los grupos experimentales C, C+E, OM y OM+E.

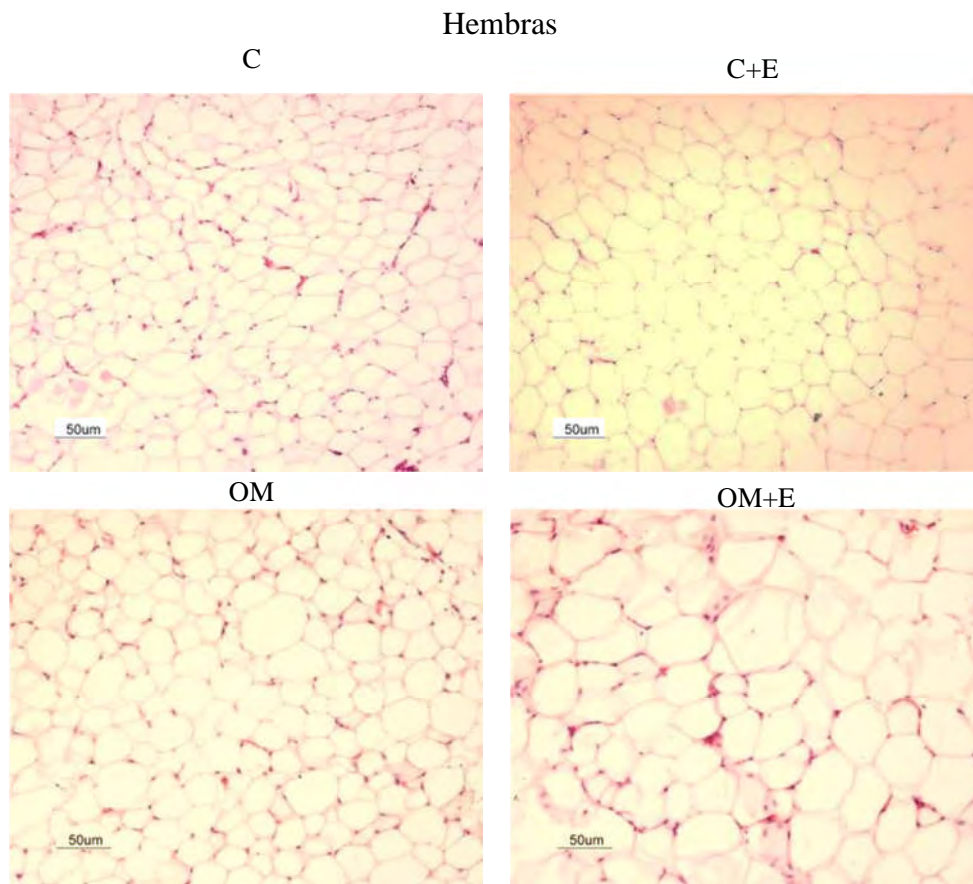


Figura 8.14. Tejido adiposo retroperitoneal de hembras F1 de 110 d. Cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina observados a 50X correspondientes a los grupos experimentales C, C+E, OM y OM+E.

La frecuencia relativa correspondiente a cada intervalo de 500 μm en los machos y 200 μm en las hembras los histogramas fue comparada con la frecuencia relativa calculada con los parámetros estimados de la distribución gamma en cada grupo (Fig.7.15.A y 7.15.B.). La bondad de ajuste se determinó por χ^2 y se alcanzó $p < 0.001$ en todos los casos.

La distribución en crías MO fue menos asimétrica que C, mientras que en los grupos que hicieron ejercicio (C + E y MO + E) la asimetría y dispersión se redujeron respecto a C y MO.

A. Machos

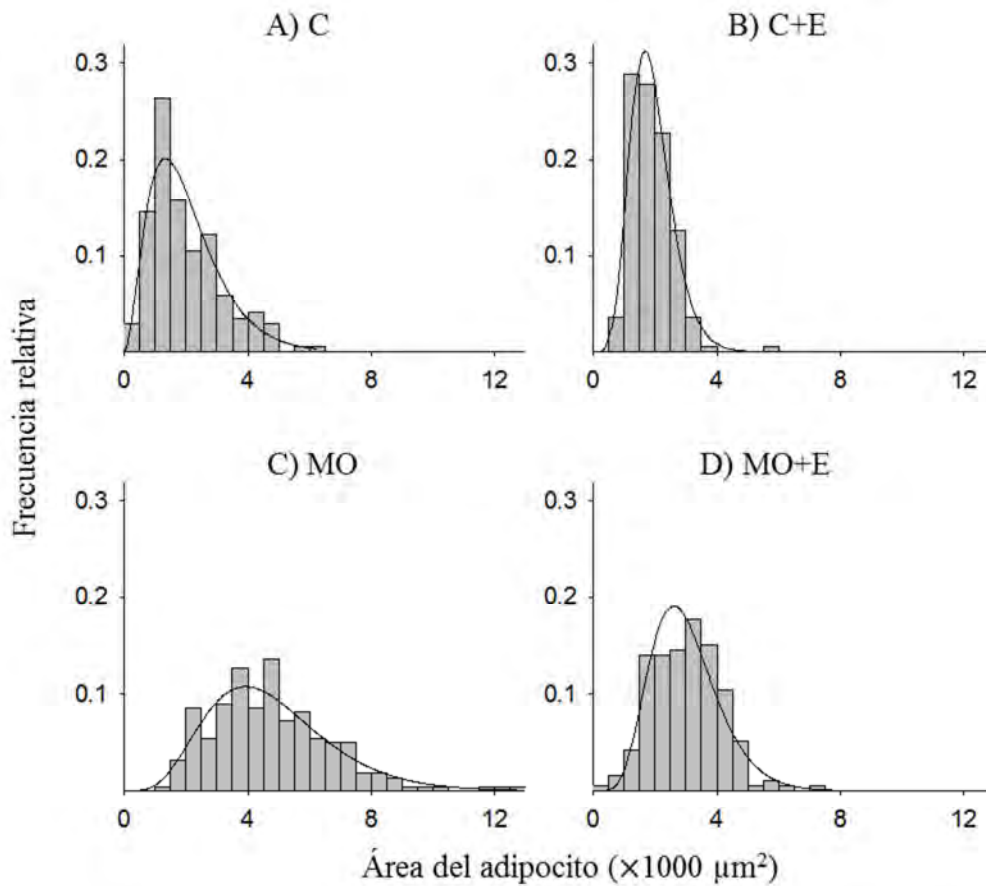


Figura 8.15. Distribución del tamaño del adipocito de machos F1 de 110 d. Histograma de frecuencias relativas (barras grises) y función de densidad de probabilidad gamma (línea continua) con los parámetros de cada grupo.

B. Hembras

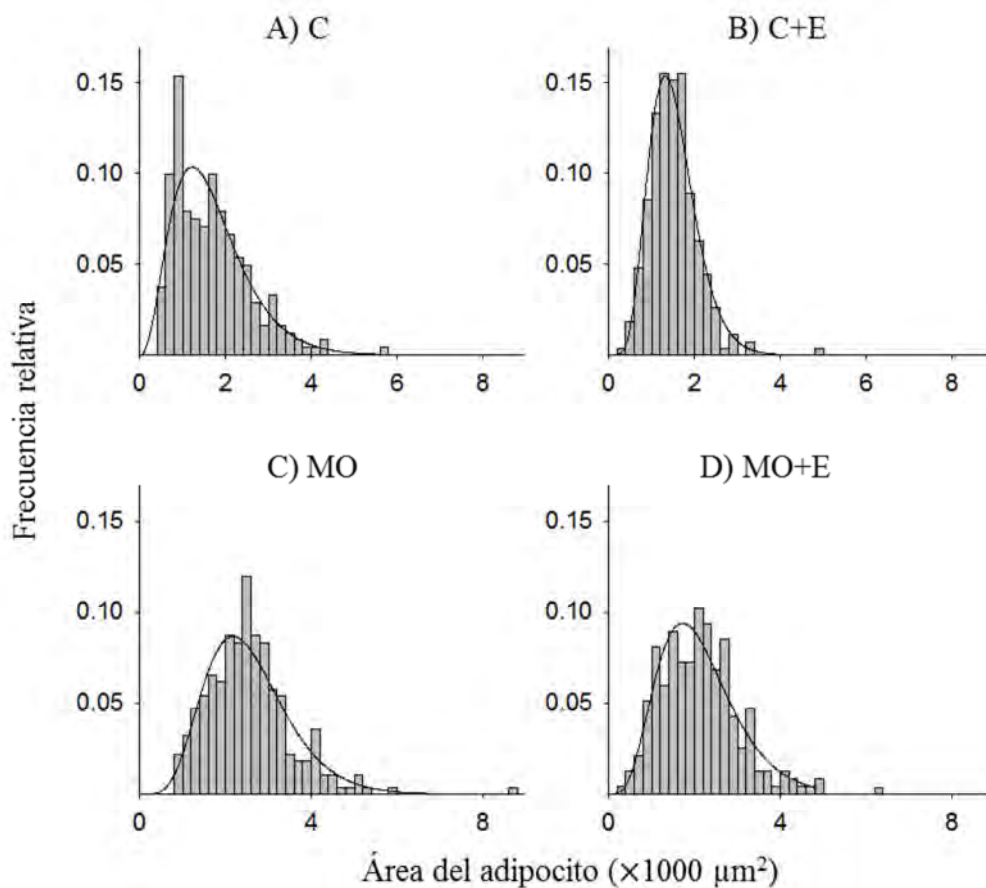


Figura 8.16. Distribución del tamaño del adipocito de hembras F1 de 110 d. Histograma de frecuencias relativas (barras grises) y función de densidad de probabilidad gamma (línea continua) con los parámetros de cada grupo.

Con el total de datos de cada grupo se calcularon: la media, desviación estándar, moda los parámetros de la distribución gamma, así como la asimetría y curtosis (Tabla 8.3).

Tabla 8.3. Parámetros estimados de la distribución del tamaño del adipocito. Se muestran medidas de tendencia central, desviación estándar y los parámetros de la distribución gamma además de la asimetría y curtosis correspondientes a cada grupo, n= adipocitos medidos.

Grupo	C	C+E	OM	OM+E
Machos				
n	179	198	218	192
Media (μm^2)	2035	1902	4727	3014
Desviación estándar (μm^2)	1156	672	1985	1106
Moda (μm^2)	1379	1665	3894	2608
a	3.1012	8.0065	5.6724	7.4274
b	0.0015	0.0042	0.0012	0.0025
Asimetría	1.14	0.71	0.84	0.73
Exceso de curtosis	1.93	0.75	1.05	0.81
Hembras				
n	240	270	276	235
Media (μm^2)	1678	1519	2558	2126
Desviación estándar (μm^2)	874.8	548.3	984.3	926.5
Moda (μm^2)	1222	1321	2180	1723
a	3.6783	7.6769	6.7555	5.2672
b	0.0022	0.0051	0.0026	0.0025
Asimetría	1.04	0.72	0.77	0.87
Exceso de curtosis	1.62	0.78	0.89	1.14

Respecto a la moda se pudo observar en machos y hembras que en OM este valor se desplazó hacia valores más grandes respecto a C mientras que en el grupo OM+E esta tendencia se revirtió situando a la media en un valor intermedio en ambos grupos. Respecto a la forma de la distribución en los machos MO fue menos asimétrica que C, mientras que los grupos que hicieron ejercicio (C+E y MO+E) la asimetría y dispersión se redujeron respecto a C y MO. En las crías hembras la distribución en crías MO fue más simétrica que C, mientras que los grupos que hicieron ejercicio (C+E y MO+E) redujeron su dispersión respecto a C y MO.

9. DISCUSIÓN

Los cambios económicos, tecnológicos y de estilos de vida han producido la abundancia de comida barata y con alto contenido calórico asociados con la disminución de la actividad física necesaria, en otras palabras estamos comiendo más y moviéndonos menos. Dado el aumento de la prevalencia de obesidad en mujeres embarazadas (Nelson, Matthews et al. 2010) se ha propuesto en modelos experimentales la intervención tanto nutricional como con ejercicio en la obesidad materna para prevenir el daño metabólico en los descendientes (Zambrano 2010), sin embargo, aún es necesario el desarrollo de medidas de intervención directamente en la progeñie de madres obesas que permitan compensar las afectaciones metabólicas.

La obesidad es un problema de salud pública que se ha incrementado sustancialmente en las últimas décadas y probablemente permanezca en el futuro próximo (Leddy, Power et al. 2008), pues no sólo la obesidad materna afecta a la mujer que la padece, sino que también impacta en la salud de los descendientes en quienes se ha propuesto que tienen mayor riesgo de padecer obesidad y diabetes mellitus tipo II, generando un círculo vicioso transgeneracional (Dabelea and Crume 2011). De esta manera, se ha demostrado con animales que el consumo de dieta alta en grasa antes y durante la preñez, predispone a la progeñie a padecer obesidad en la edad adulta, además se ha observado que la obesidad materna y no el consumo de dieta alta en grasa *per se* es mecanismo primario por el cual la progeñie es conducida a la obesidad (White, Purpera et al. 2009).

En el presente estudio la obesidad materna se modeló alimentando a hembras experimentales con dieta alta en grasa desde los 21 d hasta los 90 d en hembras F0 del grupo OM, lo cual produjo aumento significativo en el peso corporal respecto al C; sin embargo, se ha propuesto que los efectos metabólicos adversos ocasionados por la dieta alta en grasa preceden a los cambios detectables en el peso corporal, ya que se ha observado aumento significativo en la acumulación de grasa corporal en roedores en tan solo 4 semanas de alimentación con dieta alta en grasa (McDonald, Pesarchuk et al. 2011), suponiendo afectación metabólica de las madres F0 del grupo OM desde antes de la

concepción, la cual se manifestó mediante la elevación de la concentración de glucosa, insulina, triacilglicéridos y leptina a los 120 d.

Dichas afectaciones metabólicas implican posibles daños en las células germinales, como se ha demostrado en roedores, donde las hembras con obesidad inducida por dieta alta en grasa presentan mayor cantidad de folículos ováricos apoptóticos, ovocitos más pequeños y menos maduros, e incluso con mayor cantidad de alteraciones cromosómicas (Jungheim, Schoeller et al. 2010; Luzzo, Wang et al. 2012).

Durante la mayor parte del periodo de gestación, las hembras F0 del grupo OM mantuvieron mayor peso corporal respecto al C; incluso al momento del parto las hembras OM presentaron mayor peso corporal respecto al C con una diferencia similar a la detectada hasta antes del apareamiento. Por lo que podríamos inferir que la mayor parte de esta diferencia en el grupo OM durante la gestación y los primeros días de lactancia corresponde a la acumulación de masa corporal alcanzada desde antes del apareamiento ocasionada por la dieta alta en grasa.

En cuanto al periodo de lactancia, llama la atención que la diferencia en el peso corporal materno F0 entre los grupos C y OM sólo se mantiene durante los tres primeros días, al observarse una reducción gradual del peso corporal en el grupo OM hasta alcanzar los mismos niveles registrados en el C durante el resto de la lactancia. No obstante, a los 21 d de lactancia se observó incremento en las madres F0 OM en la concentración de insulina, glucosa y consecuentemente en el IRI así como incremento en la leptina y triacilglicéridos. Por lo que se puede decir que el daño metabólico en las madres F0 del grupo OM permanece a lo largo de la lactancia a pesar de tener el mismo peso corporal que el C al final de la lactancia.

La reducción del peso corporal materno F0 acompañado con el aumento en la concentración de triacilglicéridos en el presente estudio, podría estar relacionado con una movilización importante de grasas, durante el periodo de lactancia. Esto se ha demostrado en perfiles lipídicos de ratas amamantando donde se ha observado un incremento en las

lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) circulantes, que permanecen hasta tres semanas post-parto (Bosch and Camejo 1967). Este hecho supone que los lípidos movilizados en la madre finalmente llegarán a la cría a través de la leche, teniendo una fuerte injerencia en la programación del desarrollo de las crías.

Al nacimiento de las crías F1 únicamente se observó menor peso corporal en los machos OM, hecho que no se contrapone a lo reportado en este modelo por nuestro equipo de trabajo anteriormente (Zambrano 2010); incluso otros grupos de investigación han observado que la obesidad materna puede reducir el tamaño fetal (Jungheim, Schoeller et al. 2010). Por otra parte, en humanos se ha observado una alta incidencia de macrosomía en descendientes de madres obesas (Ehrenberg, Mercer et al. 2004), por lo que los resultados en este estudio parecen contradictorios. Sin embargo, es necesario aclarar que en comparación con los humanos los roedores nacen menos desarrollados (Luzzo, Wang et al. 2012), por otra parte en mujeres con obesidad severa y obesidad mórbida se ha reportado una proporción significativa de nacimiento de infantes cuyo peso al nacer es menor al percentil 10 correspondiente a su edad gestacional, considerados pequeños para su edad gestacional (PEG) (Desai and Ross 2011), de hecho un estudio europeo ha reportado incidencia del 18% de PEG paridos por mujeres obesas en comparación con el 10 % de PEG de la población en general (Rajasingam, Seed et al. 2009).

Respecto a la distancia ano-genital medida al nacimiento, se observó una reducción en el grupo OM respecto al C, la cual fue independiente del tamaño de la cría. Dicho efecto morfológico congénito podría estar asociado a hipogonadismo, ya que la función reproductiva de los animales puede ser afectada por varios factores ambientales actuando en diferentes etapas del desarrollo las cuales son mediadas por cambios en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, de esta manera se han propuesto mecanismos de daños tanto testiculares como hipofisarios asociados a la obesidad (Phillips and Tanphaichitr 2010; Zambrano, Guzman et al. 2013).

En nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que la obesidad materna durante la gestación y la lactancia tiene efectos a largo plazo en la función reproductiva en los descendientes en

la edad adulta, ya que disminuye la concentración, viabilidad y motilidad del espermatozoide además de la disminución del contenido de enzimas antioxidantes y aumento de los biomarcadores de estrés oxidante (Vega-Garcia 2012).

Los animales de laboratorio normalmente se encuentran confinados en jaulas que restringen significativamente su actividad física, de tal manera que cerca del 90% del total del gasto energético diario se lleva a cabo en reposo y el 10% restante corresponde a la actividad física (Ichikawa and Fujita 1987). Este perfil de gasto energético se puede equiparar al de personas con alto nivel de sedentarismo (Ichikawa, Fujita et al. 2000). Así, el esquema de ejercicio a ritmo voluntario aplicado en el presente estudio fue capaz de mostrar efectos metabólicos importantes en la progenie F1 de madres obesas F0.

En los esquemas de ejercicio experimental en rueda para roedor comúnmente empleados en investigación, el entrenamiento se lleva a cabo alojando al animal experimental en una jaula con libre acceso a la rueda de ejercicio, en donde una rata adulta puede alcanzar un recorrido de alrededor de 3000m /d (Ichikawa, Fujita et al. 2000; Ferreira, Lamarque et al. 2006; Schroeder, Shbiro et al. 2010; Rajia, Chen et al. 2013). En dichos esquemas se evalúa la actividad física a lo largo de varias horas o de todo un día, analizando la distancia acumulada en el periodo de acceso al dispositivo, no obstante es difícil valorar periodos de actividad continua, por lo cual la restricción en el tiempo de acceso a la rueda de ejercicio (30 minutos al día) permitió estudiar mejor la intensidad del ejercicio.

Así mismo se ha reportado que en roedores con acceso libre a la rueda de ejercicio se pueden producir modificaciones en la conducta alimentaria en respuesta a la actividad física (Looy and Eikelboom 1989), lo que podría representar una desventaja al analizar los efectos metabólicos del ejercicio de manera independiente de la ingesta de la alimento.

Si bien la cantidad de actividad física para prevenir las complicaciones metabólicas no está bien determinada en humanos, las guías de la Asociación Americana del Corazón y del Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos recomiendan para mantener un buen estado de salud al menos 150 min/semana (Haskell, Lee et al. 2007). De

esta manera, el esquema propuesto de 2 lapsos de 15min de actividad/d 5 veces por semana en los cuales las ratas experimentales fueron capaces de permanecer en actividad continua (como se estableció previamente en un experimento piloto realizado por nuestro equipo de trabajo), permitió modelar la actividad física propuesta para prevenir alteración metabólica en humanos.

En cuanto a la cantidad de ejercicio realizada lo largo del esquema aplicado en el presente estudio, llama la atención que a excepción de los machos F1 C, en todos los grupos la distancia recorrida por sesión en la segunda mitad del esquema fue mayor que en la segunda mitad. Esto podría deberse a que el ejercicio voluntario parece ser intrínsecamente gratificante para las hembras OM y C y los machos del grupo OM, es decir la realización del ejercicio en rueda para roedor por sí misma parece proporcionar satisfacción. Se ha descrito en modelos experimentales donde se condiciona la posibilidad de realizar el ejercicio, que las ratas llevan a cabo una variedad de respuestas operantes para ganar el acceso a la rueda (Premack 1962; Premack, Schaeffer et al. 1964; Novak, Burghardt et al. 2012). Incluso el ejercicio voluntario de libre acceso a la rueda ha sido propuesto como modelo de dependencia a la actividad física en un sentido adictivo (Ferreira, Lamarque et al. 2006).

Además, se ha demostrado en ratas, que la exposición perinatal a dietas densamente calóricas promueve la sensibilidad a drogas de abuso (Bocarsly, Barson et al. 2012), implicando posible predisposición a conductas de tipo adictivo en las crías descendientes de madres obesas, lo cual podría explicar por qué el patrón de aumento en la cantidad de ejercicio a lo largo del esquema fue mucho más marcado en machos y hembras F1 OM+E que en C+E.

También, se ha reportado que el ejercicio voluntario en rueda para roedor es mayor en hembras que en machos (Tokuyama, Saito et al. 1982; Eikelboom and Mills 1988; Devaud, Walls et al. 2012) lo cual es consistente con los resultados obtenidos en este trabajo, ya que hembras F1 tanto C como OM realizaron casi el doble de ejercicio que los machos. No obstante, llama la atención que a pesar de que las hembras realizaron más ejercicio que los

machos, los machos mostraron mayores efectos en los diferentes parámetros metabólicos como se discutirá más adelante.

Aunque no hubo diferencias significativas en peso corporal, ni en la ingesta alimentaria posterior al esquema de ejercicio se observaron cambios en la acumulación de tejido adiposo en los machos y cambios en la concentración de leptina en machos y hembras, sugiriendo que los cambios metabólicos programados son diferentes en hembras y en machos.

En el caso de las crías macho, el grupo OM mostró incremento en el IA, mientras que en el grupo OM+E se observó recuperación con valores similares al C, por lo que se puede decir que el ejercicio previene en los machos el daño metabólico que hace que se acumule mayor proporción de tejido adiposo en OM.

Se ha demostrado que la cantidad de tejido adiposo está correlacionada con la secreción de leptina (Benoit, Clegg et al. 2004). Por lo que en los machos, la disminución del IA en OM+E es concordante con los valores obtenidos de la concentración periférica de leptina, ya que se observó un incremento en la concentración del grupo OM y recuperación en el grupo OM+E. No obstante en el grupo C+E, a pesar de que no se observó disminución en el IA respecto al C, la concentración de leptina fue menor en C+E respecto a C, sugiriendo que la disminución en las concentraciones de leptina no solo es debida a la pérdida de tejido adiposo durante la intervención, sino que probablemente esté implicada una mayor sensibilización a esta hormona por el ejercicio o bien cambios en el adipocito relacionados al tamaño como se discutirá más adelante.

En el caso de las hembras descendientes de la obesidad materna, no fue posible revertir la concentración de leptina con el esquema de intervención con ejercicio, sin embargo, a los 110 d no son tan evidentes las afectaciones en el IA por obesidad materna.

En el caso del metabolismo de la glucosa, en el presente estudio solo se observaron alteraciones significativas en las crías macho en las cuales la insulina y el IRI se

incrementaron en los grupos OM y OM+E lo que sugiere que la intervención con ejercicio de este esquema no es capaz de revertir la resistencia a la insulina, pero no puede descartarse que un periodo de intervención más largo podría ser efectivo.

Se cree que algunos aspectos del metabolismo como la resistencia a la insulina (McLaughlin, Sherman et al. 2007; Yang, Eliasson et al. 2012) y secreción de adipocinas (Skurk, Alberti-Huber et al. 2007) dependen de una distribución precisa de tamaño del adipocito más que el tamaño promedio de las células.

Se han llevado a cabo estudios enfocados en las diferencias de la distribución bajo diferentes condiciones en diferentes especies (Jo, Gavrilova et al. 2009), no obstante, las mediciones de tamaño suelen hacerse en adipocitos aislados que son medidos y contabilizados por métodos automatizados. Quizás se recurre a este tipo de técnicas debido a la falta de un modelo adecuado para la distribución del área de los adipocitos en un corte histológico.

De acuerdo a la distribución de tamaños del adipocito en este estudio, representada visualmente por medio de histogramas, se observó en todos los grupos una distribución sesgada, donde la moda es menor a la media y por lo tanto asimétrica, la cual no se ajusta a la distribución normal. Además de la asimetría de la distribución, la disminución gradual en la proporción de tamaños mayores a la media y debido a que el área de una superficie es siempre un valor no negativo, hace que este tipo de variable cumpla con los criterios compatibles con una distribución gamma (Mendenhall, Wackerly et al. 1990).

Así, el ajuste de la función de distribución gamma a la frecuencia observada en los histogramas tuvo un nivel de significancia alto. De esta forma se pueden visualizar numéricamente las características de la distribución gama, respecto al sesgo hacia la derecha, se puede notar que la moda en todos los grupos es menor que la media. Respecto al agrupamiento podemos observar que el parámetro de forma (α) entre más grande sea hará que la distribución se aproxime más la distribución normal ya que reduce el apuntalamiento reduciendo el exceso de curtosis y disminuye el sesgo a la derecha, respecto al parámetro

(b) observamos que a mayores valores la distribución presenta menor dispersión y viceversa.

El análisis de los parámetros de forma y de escala inverso resulta valioso en la distribución del tamaño del adipocito, ya que debido a las características de esta distribución, podrían haber distribuciones con la misma media pero parámetros muy diferentes (Mendenhall, Wackerly et al. 1990), tal vez esta sea una de las razones por lo que la distribución de tamaño del tejido adiposo se asocia más a sus efectos metabólicos que utilizando a la media como único parámetro en el análisis. Dado que la distribución gamma no es simétrica, la media no resulta una medida de tendencia central muy eficiente, debido a que no es evidente donde se encuentra en la distribución, a diferencia de la moda la cual puede ser aproximada visualmente en el histograma y puede ser ubicada con precisión.

Es importante hacer hincapié en que a pesar de que en este estudio no se determinó ningún indicador directo de hiperplasia en el tejido adiposo (o de la cantidad de células), el ajuste a distribución gamma es útil en el análisis de dispersión del tamaño del adipocito, ya que denota la presencia de adipocitos extremadamente grandes o extremadamente pequeños. Lo cual podría ser un indicador de la dinámica de crecimiento del tejido adiposo, por ejemplo, el aumento en la dispersión del tamaño del adipocito en OM podría sugerir proliferación de nuevas células adiposas debido a que por una parte podría haber células en crecimiento que tengan tamaños cercanos a cero y por otra parte células muy grandes llegando a su tamaño crítico en el que desencadenan la señalización para la proliferación.

De acuerdo a los valores obtenidos del parámetro b , en los machos intervenidos con ejercicio C+E y MO+E se observó menor dispersión e incluso en el histograma se observa una distribución más estrecha que la de los grupos no intervenidos C y OM, lo cual podría estar reflejando la falta de proliferación en C+E y MO+E, dado que la frecuencia de tamaños extremadamente pequeños y extremadamente grandes es baja en comparación con C y OM respectivamente, posiblemente implica que existan pocos adipocitos recién diferenciados (de tamaño pequeño) y que los adipocitos más grandes se encuentren lejos de alcanzar el tamaño crítico para iniciar la proliferación de nuevos adipocitos, probablemente

esto haga que la distribución de tamaño del adipocito sea más simétrica, de acuerdo a la asimetría calculada en los grupos intervenidos.

En el caso de las hembras, la dispersión de tamaño del adipocito solo se redujo en el grupo C+E respecto al C, lo que podría sugerir la falta de proliferación como en el caso de los machos. No obstante, en las hembras del grupo OM+E no se observó reducción en la dispersión, pero el valor de la media y la moda fueron menores que en el grupo OM, por lo que se puede decir que si bien en el grupo OM+E no se podría sugerir reducción en la proliferación, el tamaño del adipocito muestra una reducción considerable.

10. CONCLUSIONES

El consumo de dieta alta en grasa por ratas hembra F0 produce alteraciones morfológicas, hormonales y bioquímicas características de la obesidad materna; a su vez, los descendientes F1 de F0 presentan diversas alteraciones metabólicas asociadas a la acumulación de tejido adiposo y distribución de tamaño del adipocito siendo diferentes los efectos observados en las hembras y en los machos

El modelo de ejercicio a ritmo voluntario en rueda para roedor en sesiones de 30 minutos al día, es capaz de compensar parcial o totalmente algunas de las alteraciones metabólicas de la progenie F1 asociadas a la obesidad materna de acuerdo al sexo de las crías. Además el ejercicio fue capaz de producir efectos benéficos en el tejido adiposo de los descendientes del grupo C.

Se puede inferir que un estilo de vida saludable que incluya actividad física regular en los descendientes de madres obesas, puede funcionar como una medida de intervención valiosa para reducir el daño metabólico asociado al insulto materno y de esta forma evitar su progresión hasta la enfermedad.

11. LITERATURA CITADA

- Armitage, J. A., L. Lakasing, et al. (2005). "Developmental programming of aortic and renal structure in offspring of rats fed fat-rich diets in pregnancy." The Journal of physiology **565**(Pt 1): 171-184.
- Armitage, J. A., P.D. Taylor, and L. Poston (2005). " Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy rich diet during development." J Physiol **565**(Pt 1): 3-8.
- Baeten, J. M., E. A. Bukusi, et al. (2001). "Pregnancy complications and outcomes among overweight and obese nulliparous women." American Journal of Public Health **91**(3): 436-440.
- Bayol, S. A., B. H. Simbi, et al. (2005). "A maternal cafeteria diet during gestation and lactation promotes adiposity and impairs skeletal muscle development and metabolism in rat offspring at weaning." The Journal of physiology **567**(Pt 3): 951-961.
- Benoit, S. C., D. J. Clegg, et al. (2004). "Insulin and leptin as adiposity signals." Recent Prog Horm Res **59**: 267-285.
- Benoit, S. C., D. J. Clegg, et al. (2004). "Insulin and leptin as adiposity signals." Recent progress in hormone research **59**: 267-285.
- Berg, J. M., J. L. Tymoczko, et al. (2012). Biochemistry. New York Basingstoke Palgrave Macmillan, W.H. Freeman ;
- Bocarsly, M. E., J. R. Barson, et al. (2012). "Effects of perinatal exposure to palatable diets on body weight and sensitivity to drugs of abuse in rats." Physiology & behavior **107**(4): 568-575.
- Bosch, V. and G. Camejo (1967). "Serum lipoproteinemia in pregnant and lactating rats." Journal of lipid research **8**(2): 138-141.
- Bruce, K. D., F. R. Cagampang, et al. (2009). "Maternal high-fat feeding primes steatohepatitis in adult mice offspring, involving mitochondrial dysfunction and altered lipogenesis gene expression." Hepatology **50**(6): 1796-1808.
- Castro, L. C. a. R. L. A. (2002). "Maternal obesity and pregnancy outcome " Curr Opin Obstet Gynecol **14**(6): 601-606.
- Cinti, S. (2005). "The adipose organ." Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids **73**(1): 9-15.
- Cormack, D. H. (2001). Essential histology. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- Cunningham, F. G. a. J. W. W. (2005). Williams obstetrics 22nd ed. New York, McGraw-Hill Professional.
- Dabelea, D. and T. Crume (2011). "Maternal environment and the transgenerational cycle of obesity and diabetes." Diabetes **60**(7): 1849-1855.
- Desai, M. and M. G. Ross (2011). "Fetal programming of adipose tissue: effects of intrauterine growth restriction and maternal obesity/high-fat diet." Seminars in reproductive medicine **29**(3): 237-245.
- Devaud, L. L., S. A. Walls, et al. (2012). "Voluntary wheel running attenuates ethanol withdrawal-induced increases in seizure susceptibility in male and female rats." Pharmacology, biochemistry, and behavior **103**(1): 18-25.

- DiGirolamo, M., J. B. Fine, et al. (1998). "Qualitative regional differences in adipose tissue growth and cellularity in male Wistar rats fed ad libitum." The American journal of physiology **274**(5 Pt 2): R1460-1467.
- Ehrenberg, H. M., B. M. Mercer, et al. (2004). "The influence of obesity and diabetes on the prevalence of macrosomia." American journal of obstetrics and gynecology **191**(3): 964-968.
- Eikelboom, R. and R. Mills (1988). "A microanalysis of wheel running in male and female rats." Physiology & behavior **43**(5): 625-630.
- Faust, I. M., P. R. Johnson, et al. (1978). "Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity." The American journal of physiology **235**(3): E279-286.
- Ferenc, J.-S. and Z. Nédá (2007). "On the size distribution of Poisson Voronoi cells." Physica Acta **385**: 518-526.
- Ferreira, A., S. Lamarque, et al. (2006). "Spontaneous appetite for wheel-running: a model of dependency on physical activity in rat." European psychiatry : the journal of the Association of European Psychiatrists **21**(8): 580-588.
- Fischer, A. H., K. A. Jacobson, et al. (2008). "Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections." CSH protocols **2008**: pdb prot4986.
- Friedman, J. M. (2002). "The function of leptin in nutrition, weight, and physiology." Nutrition reviews **60**(10 Pt 2): S1-14; discussion S68-84, 85-17.
- Gluckman, P. and M. Hanson, Eds. (2006). Developmental Origins of Health and Disease, Cambridge University Press.
- González Jiménez, E. (2013). "Obesity: etiologic and pathophysiological analysis." Endocrinología y nutrición : organo de la Sociedad Espanola de Endocrinología y Nutricion **60**(1): 17-24.
- Gutiérrez, J., J. Rivera-Dommarco, et al. (2012). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, Morelos, Instituto Nacional de Salud Pública.
- Haskell, W. L., I. M. Lee, et al. (2007). "Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association." Medicine and science in sports and exercise **39**(8): 1423-1434.
- Ichikawa, M. and Y. Fujita (1987). "Effects of nitrogen and energy metabolism on body weight in later life of male Wistar rats consuming a constant amount of food." The Journal of nutrition **117**(10): 1751-1758.
- Ichikawa, M., Y. Fujita, et al. (2000). "Effects of long-term, light exercise under restricted feeding on age-related changes in physiological and metabolic variables in male Wistar rats." Mechanisms of ageing and development **113**(1): 23-35.
- Ishii, T., R. Muranaka, et al. (2007). "Chronic intracerebroventricular administration of anti-neuropeptide Y antibody stimulates starvation-induced feeding via compensatory responses in the hypothalamus." Brain research **1144**: 91-100.
- Jo, J., O. Gavrilova, et al. (2009). "Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth." PLoS computational biology **5**(3): e1000324.
- Jungheim, E. S., E. L. Schoeller, et al. (2010). "Diet-induced obesity model: abnormal oocytes and persistent growth abnormalities in the offspring." Endocrinology **151**(8): 4039-4046.

- Katsura, Y., H. Wada, et al. (2013). "PTK787/ZK222584 Combined with Interferon Alpha and 5-Fluorouracil Synergistically Inhibits VEGF Signaling Pathway in Hepatocellular Carcinoma." Annals of surgical oncology.
- Kennedy, G. C. (1953). "The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat." Proc R Soc Lond B Biol Sci **140**(901): 578-596.
- Kennedy, G. C. (1953). "The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat." Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. Royal Society **140**(901): 578-596.
- Kirk, S. L., Samuelsson, A.-M., Argenton, M., Dhonye, H., Kalamatianos, T., Poston, L., Taylor, P. D., and Coen, C. W. (2009). "Maternal obesity induced by diet in rats permanently influences central processes regulating food intake in offspring." PLoS ONE **4**: e5870.
- Knobil, E. and J. D. Neill (2006). Knobil and Neill's physiology of reproduction. Amsterdam ; Boston, Elsevier.
- Kopp-Hoolihan, L. E., M. D. Van Loan, et al. (1999). "Fat mass deposition during pregnancy using a four-component model." Journal of Applied Physiology **87**(1): 196-202.
- Kumar, M. V., G. D. Sunvold, et al. (1999). "Dietary vitamin A supplementation in rats: suppression of leptin and induction of UCP1 mRNA." Journal of lipid research **40**(5): 824-829.
- Laitinen, J., C. Power, et al. (2001). "Family social class, maternal body mass index, childhood body mass index, and age at menarche as predictors of adult obesity." The American journal of clinical nutrition **74**(3): 287-294.
- Leddy, M. A., M. L. Power, et al. (2008). "The impact of maternal obesity on maternal and fetal health." Reviews in obstetrics and gynecology **1**(4): 170-178.
- Lehninger, A. L., D. L. Nelson, et al. (2008). Lehninger principles of biochemistry. New York, W.H. Freeman.
- Levine, J. A. (2005). "Measurement of energy expenditure." Public health nutrition **8**(7A): 1123-1132.
- Looy, H. and R. Eikelboom (1989). "Wheel running, food intake, and body weight in male rats." Physiology & behavior **45**(2): 403-405.
- Luzzo, K. M., Q. Wang, et al. (2012). "High fat diet induced developmental defects in the mouse: oocyte meiotic aneuploidy and fetal growth retardation/brain defects." PLoS one **7**(11): e49217.
- Mahan, L. K., S. Escott-Stump, et al. (2012). Krause's food & the nutrition care process. St. Louis, Mo., Elsevier/Saunders.
- Matthews, D. R., J. P. Hosker, et al. (1985). "Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man." Diabetologia **28**(7): 412-419.
- Mc Curdy, C. E., Bishop, J.M., Williams, S. M., Grayson, B.E., Smith, M.S., Friedman, J.E., and Grove, K.L. (2009). "Maternal high-fat diet triggers lipotoxicity in the fetal livers of non human primates." J. Clin. Invest. **119**: 323-335.
- McDonald, S. D., E. Pesarchuk, et al. (2011). "Adverse metabolic effects of a hypercaloric, high-fat diet in rodents precede observable changes in body weight." Nutrition research **31**(9): 707-714.

- McLaughlin, T., A. Sherman, et al. (2007). "Enhanced proportion of small adipose cells in insulin-resistant vs insulin-sensitive obese individuals implicates impaired adipogenesis." Diabetologia **50**(8): 1707-1715.
- Mendenhall, W., D. D. Wackerly, et al. (1990). Mathematical statistics with applications. Boston, PWS-Kent Pub. Co.
- Méndez-Sánchez, N. and M. U. Esquivel, Eds. (2002). Obesidad: epidemiología, fisiopatología y manifestaciones clínicas. México, El Manual Moderno.
- Moreno, M. J. and J. A. Martínez (2002). "[Adipose tissue: a storage and secretory organ]." Anales del sistema sanitario de Navarra **25 Suppl 1**: 29-39.
- Muhlhausler, B. S., Duffield, J.A., and McMillen, I.C. (2007). "Increased maternal nutrition stimulates peroxisome proliferator activated receptor-gamma, adiponectin, and leptin messenger ribonucleic acid expression in adipose tissue before birth." Endocrinology **148**: 878-885.
- Nelson, S. M., P. Matthews, et al. (2010). "Maternal metabolism and obesity: modifiable determinants of pregnancy outcome." Human reproduction update **16**(3): 255-275.
- Nijland, M. J., S. P. Ford, et al. (2008). "Prenatal origins of adult disease." Current opinion in obstetrics & gynecology **20**(2): 132-138.
- Novak, C. M., P. R. Burghardt, et al. (2012). "The use of a running wheel to measure activity in rodents: relationship to energy balance, general activity, and reward." Neuroscience and biobehavioral reviews **36**(3): 1001-1014.
- Panik, M. J. (2005). Advanced statistics from an elementary point of view. Boston, Elsevier/Academic Press.
- Phillips, K. P. and N. Tanphaichitr (2010). "Mechanisms of obesity-induced male infertility." Expert Review of Endocrinology and Metabolism, p. **5**(2): 229-251(223).
- Porte, D., Jr., D. G. Baskin, et al. (2005). "Insulin signaling in the central nervous system: a critical role in metabolic homeostasis and disease from *C. elegans* to humans." Diabetes **54**(5): 1264-1276.
- Premack, D. (1962). "Reversibility of the reinforcement relation." Science **136**(3512): 255-257.
- Premack, D., R. W. Schaeffer, et al. (1964). "Reinforcement of Drinking by Running: Effect of Fixed Ratio and Reinforcement Time." Journal of the experimental analysis of behavior **7**: 91-96.
- Rajasingam, D., P. T. Seed, et al. (2009). "A prospective study of pregnancy outcome and biomarkers of oxidative stress in nulliparous obese women." American journal of obstetrics and gynecology **200**(4): 395 e391-399.
- Rajia, S., H. Chen, et al. (2010). "Maternal overnutrition impacts offspring adiposity and brain appetite markers-modulation by postweaning diet." Journal of neuroendocrinology **22**(8): 905-914.
- Rajia, S., H. Chen, et al. (2013). "Voluntary post weaning exercise restores metabolic homeostasis in offspring of obese rats." Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD **23**(6): 574-581.
- Rode, L., L. Nilas, et al. (2005). "Obesity-related complications in Danish single cephalic term pregnancies." Obstetrics and gynecology **105**(3): 537-542.
- Salsberry, P. J. and P. B. Reagan (2007). "Taking the long view: the prenatal environment and early adolescent overweight." Research in nursing & health **30**(3): 297-307.

- Samuelsson, A.-M., Matthews, P.A., Argenton, M., Christie, M.R., McConnell, J.M., Jansen, E.H. J.M., Piersma, A.H., Ozanne, S. E., Twinn, D.F., Remacle, Claude, Rowlerson, A., Poston, L. and Taylor, P.D. (2008). "Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming." *Hypertension* **51**: 383–392. .
- Schroeder, M., L. Shbiro, et al. (2010). "Post-weaning voluntary exercise exerts long-term moderation of adiposity in males but not in females in an animal model of early-onset obesity." *Hormones and behavior* **57**(4-5): 496-505.
- Schwartz, M. W. (2006). "Central nervous system regulation of food intake." *Obesity* **14 Suppl 1**: 1S-8S.
- Schwartz, M. W., S. C. Woods, et al. (2000). "Central nervous system control of food intake." *Nature* **404**(6778): 661-671.
- Schwartz MW, W. S., Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. (2000). "Central nervous system control of food intake." *Nature*: 661-671.
- Shah, N. R. and E. R. Braverman (2012). "Measuring adiposity in patients: the utility of body mass index (BMI), percent body fat, and leptin." *PloS one* **7**(4): e33308.
- Solomons, N. W. (2009). "Developmental origins of health and disease: concepts, caveats, and consequences for public health nutrition." *Nutrition reviews* **67 Suppl 1**: S12-16.
- Sturges, H. (1926). "The choice of a class-interval." *J. Amer. Statist. Assoc* **21**: 65–66.
- Tanemura, M. (2003). "Statistical Distributions of Poisson Voronoi Cells in Two and Three Dimensions." *Forma* **18**: 221-247.
- Tappy, L. (1996). "Thermic effect of food and sympathetic nervous system activity in humans." *Reproduction, nutrition, development* **36**(4): 391-397.
- Tartaglia, L. A., M. Dembski, et al. (1995). "Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R." *Cell* **83**(7): 1263-1271.
- Taylor, B. A. and S. J. Phillips (1996). "Detection of obesity QTLs on mouse chromosomes 1 and 7 by selective DNA pooling." *Genomics* **34**(3): 389-398.
- Taylor, P. D. and L. Poston (2007). "Developmental programming of obesity in mammals." *Experimental physiology* **92**(2): 287-298.
- Taylor, P. D. a. L. P. (2007). "Developmental programming of obesity in mammals." *Exp Physiol*, **92**(2): 287-298.
- Tokuyama, K., M. Saito, et al. (1982). "Effects of wheel running on food intake and weight gain of male and female rats." *Physiology & behavior* **28**(5): 899-903.
- Vega-Garcia, C. B., L.; Reyes-Castro, L.; Vazquez, M.; Cruz-Perez, F.; Nathanielsz, P.W.; Larrea, F.; Zambrano, E.; (2012). "Voluntary Exercise (Ex) Reverses Increases in Oxidative Stress (OS) and Impaired Sperm Function in Offspring (OFF) of Obese Rats." *REPRODUCTIVE SCIENCES*; **19**(3).
- Vega, C. C., L. A. Reyes-Castro, et al. (2013). "Exercise in obese female rats has beneficial effects on maternal and male and female offspring metabolism." *International journal of obesity*.
- Vickers, M. H. and D. M. Sloboda (2012). "Strategies for reversing the effects of metabolic disorders induced as a consequence of developmental programming." *Frontiers in physiology* **3**: 242.

- Wadhwa, P. D., et al. (2009). "Developmental origins of health and disease: brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms." Semin Reprod Med,27(5): 358-368.
- White, C. L., M. N. Purpera, et al. (2009). "Maternal obesity is necessary for programming effect of high-fat diet on offspring." American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology **296**(5): R1464-1472.
- Yang, J., B. Eliasson, et al. (2012). "The size of large adipose cells is a predictor of insulin resistance in first-degree relatives of type 2 diabetic patients." Obesity **20**(5): 932-938.
- Yates, A. A. (2005). Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. Washington, D.C., National Academies Press ; Oxford : Oxford Publicity Partnership [distributor].
- Zambrano, E., et al. (2010). "Dietary intervention prior to pregnancy reverses metabolic programming in male offspring of obese rats." J Physiol, **588**(Pt 10): 1791-1799.
- Zambrano, E., C. Guzman, et al. (2013). "Fetal programming of sexual development and reproductive function." Molecular and cellular endocrinology.
- Zhang, Y., R. Proenca, et al. (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." Nature **372**(6505): 425-432.
- Zhou, Y. T., M. Shimabukuro, et al. (1997). "Induction by leptin of uncoupling protein-2 and enzymes of fatty acid oxidation." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**(12): 6386-6390.

12. TRABAJOS RELACIONADOS

Trabajo presentado en el LII Congreso Internacional de Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología A.C. Del 27 de noviembre al 1 de diciembre de 2012. León Guanajuato.

EL EJERCICIO PREVIENE ALTERACIONES EN LA ADIPOSIDAD DE LOS MACHOS DESCENDIENTES DE RATAS CON OBESIDAD EXPERIMENTAL

Carlos A. Ibáñez¹ (Elena Zambrano*), Claudia J. Bautista^{1*}, Luis A. Reyes^{1*}, Omar S. Ahuactzi¹, Fernando Larrea^{1*} y Elena Zambrano^{1*}. Departamento Biología de la Reproducción¹. INCMNSZ. México D.F.



Departamento de Biología de la Reproducción
Dr. Carlos Gual Castro*

Introducción

La exposición a ambientes adversos durante etapas críticas del desarrollo como la gestación y lactancia puede modificar la fisiología y metabolismo de la progenie en la vida posnatal. En estudios epidemiológicos se ha demostrado relación directa entre el índice de masa corporal (IMC) materno y el IMC de la descendencia. Por otro lado, en animales descendientes de madres con obesidad experimental se ha observado acumulación incrementada de tejido adiposo y resistencia a la insulina en la vida posnatal. No obstante, existe poca información que demuestre si la intervención con ejercicio en la descendencia puede prevenir parcial o totalmente dichas alteraciones.

Objetivo

Determinar el efecto del ejercicio en ratas descendientes de la obesidad materna (OM) en parámetros bioquímicos, hormonales y tisulares vinculados con el metabolismo energético.

Material y métodos

Madres Experimentales



Figura 1. Alimentación materna desde el destete. Hembras Wistar alimentadas con dieta Chow para el grupo Control (C) y dieta alta en grasa para el grupo de Obesidad Materna (OM). Ambos grupos fueron apareados a los 120 días (d) de edad.



Figura 2. Dispositivos experimentales para realización de actividad física por las crías. Ejercicio (2 series de 15 min/día 5 veces por semana de los 50-110 días (d) de edad).



Figura 3. A) Esquema de alimentación materna y ejercicio en las crías. B) Línea del tiempo del experimento. La alimentación materna se llevó a cabo con dieta chow o alta en grasa y se realizó la intervención con ejercicio en las crías macho alimentadas con dieta control descendientes de ambos grupos maternos

Agradecemos el apoyo de la Fundación Mexicana para la Salud (FUNSALUD)

Resultados

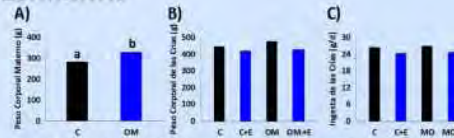


Figura 4. A) Peso corporal materno antes de la concepción a los 120 d. B) Peso corporal e C) ingesta de alimento de las crías a los 110d. Media \pm EE, n=8, P<0.05, datos con diferente letra.

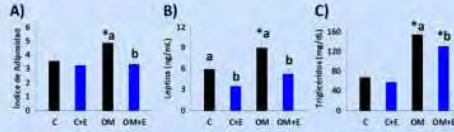


Figura 5. A) Índice de adiposidad (IA), B) Leptina y C) triglicéridos en suero de las crías a los 110d. IA= (peso tejido adiposo X 100)/peso corporal tomados en la necropsia. Media \pm EE, n=8, P<0.05 para grupos con diferente alimentación materna y mismo esquema de ejercicio (*) y grupos con misma alimentación materna y diferente esquema de ejercicio (letras diferentes).

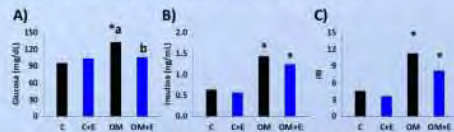


Figura 6. A) Glucosa, B) insulina sérica e C) índice de resistencia a la insulina (IRI) de las crías a los 110d. Media \pm EE, n=8, P<0.05 para grupos con diferente alimentación materna y mismo esquema de ejercicio (*) y grupos con misma alimentación materna y diferente esquema de ejercicio (letras diferentes).

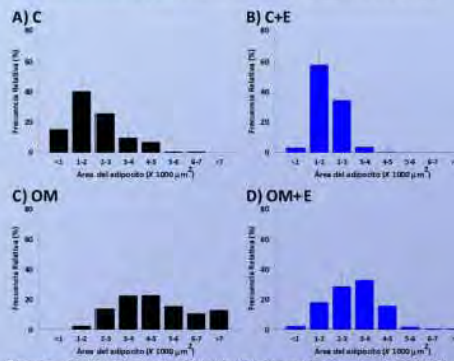


Figura 7. Distribución de tamaño del adipocito en los grupos A) C, B) C+E, C) OM y D) OM+E de las crías a los 110d. Área medida en las micrografías histológicas obtenidas del tejido adiposo retroperitoneal. Media \pm EE, n=8.

Conclusión

El ejercicio realizado de manera regular resulta beneficioso para los descendientes de la OM al revertir parcial o totalmente algunos efectos fisiopatológicos ocasionados por la alimentación materna, los cuales están asociados a la hipertrofia del tejido adiposo de la descendencia.

Trabajo presentado en la 60th Annual Meeting of the Society for Gynecologic Investigation. 20-23 de Marzo, 2013. Orlando, Florida.

Maternal Obesity (MO) Increases Maternal and Offspring Corticosterone (Cort) Production: Effects of Maternal (M) Exercise (MEx).

Carlos Ibanez,¹ Roberto Chavira,¹ Luis Reyes-Castro,¹ Claudia J Bautista,¹ Claudia Vega-García,¹ Peter W Nathanielsz,² Elena Zambrano.¹ ¹*Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, DF, Mexico;* ²*Center for Pregnancy and Newborn Research, University of Texas Health Sciences Center, San Antonio, TX, USA.*

INTRODUCTION: MO is a global epidemic. Human and animal studies indicate MO adversely affects M and offspring (OFF) health. There is a need for interventions to improve outcomes. The rodent data-base on programming by MO is large but lacks studies on M and OFF effects of MEx intervention. We hypothesized that MO increases M and OFF cort at least in part prevented by MEx.

METHODS: From weaning through pregnancy and lactation rats ate chow (C) or high energy obesogenic diet (MO). Half of C and MO mothers wheel-ran 30 min, 5 times/ week from postnatal day (PND) 90 to delivery (CEx and MOEx). All M were bred at PND 120 and continued their diet. Cort measured by RIA pre-pregnancy (n=6), mothers at end of lactation (n=8) and OFF PND 2 (n=4). Statistical analysis t test; p< 0.05.

RESULTS: MO increased M serum cort prior to breeding at PND 120 (Fig 1A) and end of lactation (Fig 1B). Ex decreased both C and MO M cort but did not normalize values. MO increased cort in pooled male and female blood of 2 d neonates (Fig 1C), Ex partially reduced cort in neonates.

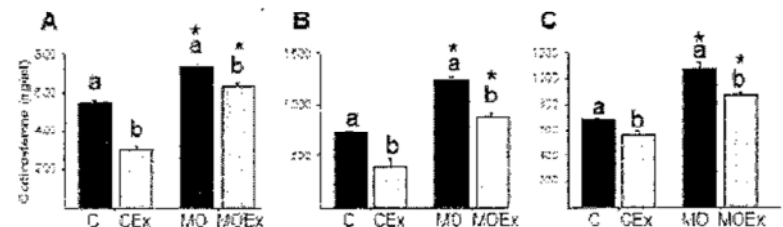


Fig 1. A) pre-pregnant (n=6), **B)** M end of lactation (n=8), **C)** male and female OFF combined PND 2 (n=4), serum cort levels. C = control, CEx = Control + exercise, MO = Maternal obesity, MOEx = Maternal obesity + exercise. M ± SEM; * p< 0.05 vs corresponding C group. Within a group, C or MO, different letters are different p < 0.05.

CONCLUSIONS: Our data address the controversy whether glucocorticoids play a significant and even possibly common role across species in programming responses to different challenges e.g. maternal stress, under and over nutrition. We have shown in other studies that maternal Ex improves but does not completely prevent adverse OFF outcomes. Our data presented show for the first time, increased cort in mothers and OFF in MO and potential prevention by MEx.

(*Reproductive Sciences. Volume 30, number 3, pag 132A. March 2013.*)

Trabajo presentado en la 60th Annual Meeting of the Society for Gynecologic Investigation. 20-23 de Marzo, 2013. Orlando, Florida.

Fat cell size distribution and lipid dysfunction in offspring following maternal and offspring (OFF) exercise interventions to prevent developmental programming resulting from maternal obesity (MO) in the rat. Benjamin Ehler, MS¹, Carlos Ibáñez, MSc², Magaly Vázquez², Luis Reyes-Castro, MSc², Claudia Vega-García, MSc², Claudia J Bautista², Joel Michalek, PhD¹, Peter W. Nathanielsz, MD, PhD, ScD³ and Elena Zambrano, PhD^{2,1}.¹Dept. Epidemiology & Biostatistics, The University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, United States, 78229. ²Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutricion SZ, DF, Mexico, 14000. ³Center for Pregnancy and Newborn Research, The University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, United States, 78229.

Introduction: MO adversely affects OFF health and lipid function. We have shown that MO alters OFF fat cell size. To enable determination of factors regulating OFF fat cell size and information on potential interventions we studied fat cell size and lipid metabolism following maternal exercise (MEX) and OFF exercise (OFFex). We hypothesized that MEX before and during pregnancy would have major effects on adipocyte cell size and lipid function and since fat cell number is thought to be fixed by birth, OFF ex would have different beneficial effects.

METHODS: From weaning through pregnancy and lactation rats ate chow (C) or high energy obesogenic diet (MO). Half the C and MO mothers wheel-ran 30 min, 5 times/ week from PND 90 to delivery (CEX and MOEX). All M were bred PND 120 and continued their diet. OFF were weaned to C. Half of the OFF wheel-ran 30 min, 5/times week from PND 50 to 110 (Cex and MOex). Male OFF were euthanized PND 110 (n=8), and fat depots weighed, serum leptin, TG and fat cell size measured. **Statistics:** one way anova; p< 0.05.

RESULTS: Fat cell size in all control groups were similar Fig 1A. Cumulative cell size was different in controls than all MO groups. MOEX was different from MO while OFF ex was intermediate between MO and MOEX. Figs 1B-E show that MO increased all lipid parameters and MOEX and OFFex had similar effects on the metabolic parameters.

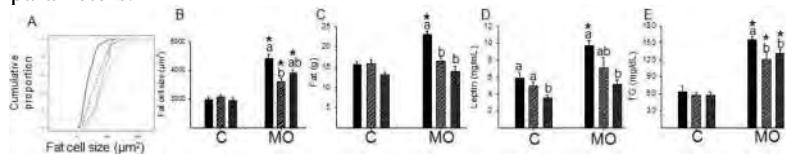


Fig 1. A) Cumulative fat cell size; solid control, dash MOEX, dots MO, grey OFFex. B-E first three columns are the three control groups and the second three are MO, MOEX and OFFex in order.

CONCLUSIONS: MOEX and OFFex have different effects on fat cell size but similar effects on lipid metabolism.

(Reproductive Sciences. Volume 30, number 3. March 2013)

Trabajo oral presentado en el Magno Congreso Internacional de Endocrinología, Diabetes y Reproducción. (XXIII Reunión de la Asociación Latinoamericana de Investigadores en Reproducción Humana), 11-14 noviembre de 2014, Cancún, Quintana Roo.

LA OBESIDAD MATERNA DE LA RATA IMPACTA NEGATIVAMENTE EL TEJIDO ADIPOSO DE LA PROGENIE: EFECTOS DE LA INTERVENCIÓN CON EJERCICIO EN LAS CRÍAS

Ibáñez-Chávez CA, Vázquez M, Reyes LA, Vega CC, Bautista CJ, Minzoni A, Nathanielsz PW, Zambrano E.

JUSTIFICACIÓN. Estudios con animales de experimentación han demostrado mayor acumulación de grasa en descendientes de madres obesas (MO). Pero existe poca información sobre la intervención con ejercicio en la progenie y sus efectos en el tejido adiposo. A la fecha no se ha reportado, para el tamaño de adipocito, una función de densidad de probabilidad (FDP) adecuada en el tejido.

OBJETIVO. Determinar los efectos del ejercicio en ratas macho descendientes de MO en la acumulación de grasa y distribución del tamaño del adipocito

MATERIALES Y MÉTODOS. Se emplearon hembras destetadas con dieta control (C) al 5% de grasa como madres C y al 25% de grasa como MO, preñadas a los 120 días de edad (d). Los descendientes se destetaron con dieta C y uno de cada camada realizó 30 minutos de actividad/día en rueda para roedor 5 veces/semana de los 50-110d. Las crías se asignaron en 4 grupos (n=8/grupo) descendientes: de madres C (C); intervenidas con ejercicio de madres C (CE); de MO (MO); e intervenidas con ejercicio de MO (MOE). De las crías de 110d, se cuantificó: el peso corporal, tejido adiposo total y área del adipocito en cortes histológicos teñidos con HE cuya distribución se ajustó a la FDP gamma biparamétrica (Ecuación. 1), estimándose en cada grupo (n>179adipocitos/grupo) los parámetros de forma (*a*) y de escala inversa (*b*), relacionados inversamente con la asimetría y dispersión celular respectivamente.

Ecuación.1. $f(x) = (b^a / \text{función. gamma}(a)) * x^{(a-1)} * e^{-bx}; x = \text{área. adipocito}$

RESULTADOS. Aunque no hubo diferencias de peso corporal entre crías, el tejido adiposo total se incrementó en MO con respecto a C, no así en MOE (C=16, CE=14, MO=23 y MOE=14 g, p<0.05). De los adipocitos en las crías C, CE, MO y MOE se obtuvo respectivamente: [área promedio (μm^2)=2035, 1902, 4727 y 3014] y los parámetros [*a*=3.1, 8.0, 5.7 y 7.4] y [*b*=0.0015, 0.0042, 0.0012 y 0.0025]. En cada grupo la FDP gamma estimada se ajustó a la distribución observada (bondad/ χ^2 : p<0.00001). La distribución en crías MO fue menos asimétrica que C, mientras que los grupos que hicieron ejercicio (CE y MOE) la asimetría y dispersión se redujeron respecto a C y MO.

CONCLUSIONES. Aunque la obesidad materna aumenta en la progenie la acumulación de grasa y tamaño del adipocito considerablemente, el ejercicio regular en la cría revierte el aumento de grasa y tamaño del adipocito reduciendo la asimetría y dispersión de su distribución, lo cual puede reducir diversos efectos metabólicos adversos asociados a la obesidad materna. Agradecemos a FUNSALUD.

Title: Maternal Obesity (MO) Has an Adverse Impact on Offspring (OFF) Adipocyte Size (AS): Effects of Male Offspring Exercise (Ex) Intervention.

Carlos A Ibáñez-Chávez, BSc¹, Magaly Vázquez, BSc¹, Antonmaria Minzoni, PhD², Peter W Nathanielsz, PhD,ScD³ and Elena Zambrano, PhD¹. ¹Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutricion SZ, Mexico City, DF, Mexico, 14000; ²Mathematics and mechanics, Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y en Sistemas UNAM, Mexico City, DF, Mexico, 04510 and ³CPNR, University of Texas Health Sciences Center, San Antonio, Texas, United States, 78229.

Introduction: Animal studies show that MO is associated with increased OFF AT. There are few data on effects of OFF exercise on OFF AT. Since adipocyte size (AS) is not normally distributed, the mean does not represent AS distribution. We have developed a probability density function (PDF) to characterize and quantify Ex effects in male OFF of MO rats on AS.

Methods: Female Wistar rats fed from weaning through pregnancy and lactation with chow (C) or high energy obesogenic diet (MO) were bred at postnatal day (PND) 120 and male OFF weaned to chow. One OFF of each litter (n=8 litter/group) wheel-ran 30 min/day 5 x a week from 50 to 110 PND (Cex and MOex) and euthanized (PND 110), AT depots weighed and retroperitoneal AS (area) measured (H&E staining). AS frequency in each OFF group was fitted to gamma PDF (Eq.1), and parameters (a) related with skewness and (b) inversely related with data dispersion (spreading) estimated.

Results: At PND 110, body weight was similar in all OFF however, total MO OFF AT was greater in MO than other groups (C=15.9±0.8, Cex=13.8±0.8, MO=22.9+.9 and MOex=14.0±1.2 g, p<0.05, Mean±SEM). AS distribution was fitted to gamma PDF (Eq 1) in each group (χ²: p<0.00001). MO was more symmetric and spread than C (Fig 1), while exercise groups (Cex and MOex) were more symmetric but less spread than C and MO. Mode was higher in MO vs C and intermediate in MOex.

Equation 1. Gamma PDF

$$f(x) = \frac{b^a}{\Gamma(a)} x^{a-1} e^{-bx};$$

where $x = \text{fat cell area}$

Table 1. Fat cell size data

Group	C	CEx	MO	MOEx
Mean (µm ²)	2035	1902	4727	3014
Standar Deviation	1155	672	1985	1106
Mode (µm ²)	1401	1668	3909	2571
a	3.1012	8.0065	5.6906	7.4274
b	0.0015	0.0042	0.0012	0.0025
Skewness	1.14	0.71	0.84	0.73
Kurtosis	1.93	0.75	1.05	0.81

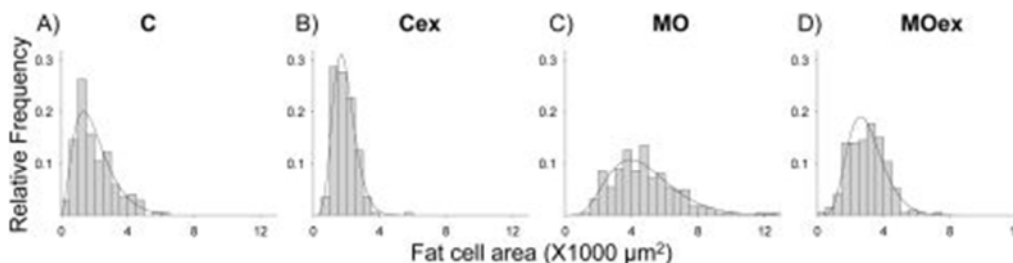


Fig.1. Relative frequency histograms of AS (bars) fitted to gamma distribution (continuous line) by its estimated parameters a and b of A) C, B) Cex, C) MO and D) MOex male OFF at PND 110.

Conclusions: MO spreads AS distribution. OFF EX prevents MO effects on AS decreasing asymmetry and spread of AS distribution. How these changes affect MO OFF metabolism remains to be established.



Maternal obesity in the rat programs male offspring exploratory, learning and motivation behavior: prevention by dietary intervention pre-gestation or in gestation

J.S. Rodríguez^b, G.L. Rodríguez-González^a, L.A. Reyes-Castro^a, C. Ibáñez^a, A. Ramírez^a, R. Chavira^a, F. Larrea^a, P.W. Nathanielsz^b, E. Zambrano^{a,*}

^a Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México City 14000, Mexico

^b Center for Pregnancy and Newborn Research, Department of Obstetrics and Gynecology, University of Texas Health Sciences Center, San Antonio, TX 78229, USA

ARTICLE INFO

Article history:
Received 15 August 2011
Received in revised form
16 December 2011
Accepted 28 December 2011

Keywords:
Developmental programming
Cognition
Stress response
Consummatory behavior
Corticosterone

ABSTRACT

We studied the effects of maternal high fat diet (HFD, 25% calories from fat administered before and during pregnancy and lactation) and dietary intervention (switching dams from HFD to control diet) at different periconceptual periods on male offspring anxiety related behavior, exploration, learning, and motivation. From weaning at postnatal day (PND) 21, female subjects produced to be the mothers in the study received either control diet (CTR – 5% calories from fat), HFD through pregnancy and lactation (MO), HFD during PNDs 21–90 followed by CTR diet (pre-gestation (PG) intervention) or HFD from PND 21 to 120 followed by CTR diet (gestation and lactation (G) intervention) and bred at PND 120. At 19 days of gestation maternal serum corticosterone was increased in MO and the PG and G dams showed partial recovery with intermediate levels. In offspring, no effects were found in the elevated plus maze test. In the open field test, MO and G offspring showed increase zone entries, displaying less thigmotaxis; PG offspring showed partial recuperation of this behavior. During initial operant conditioning MO, PG and G offspring displayed decreased approach behavior with subsequent learning impairment during the acquisition of FR-1 and FR-5 operant conditioning for sucrose reinforcement. Motivation during the progressive ratio test increased in MO offspring; PG and G intervention recuperated this behavior. We conclude that dietary intervention can reverse negative effects of maternal HFD and offspring outcomes are potentially due to elevated maternal corticosterone.

© 2012 ISDN. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Maternal obesity negatively influences maternal, fetal and offspring life-time phenotype including unwanted effects on offspring brain development, behavior, affect and cognition [for review see (Sullivan et al., 2011; Tsoi et al., 2010)]. One prospective clinical study of maternal obesity outcomes reported high inattention scores and a two-fold increase in risk of difficulties with emotional regulation in 5-year-old children (Rodríguez, 2010). In animal models, maternal obesity causes brain developmental abnormalities in offspring hypothalamic and hippocampal areas, and in the serotonergic, dopaminergic and opioid systems which result in increased anxiety, impairment in spatial learning and memory and desensitization of the reward system (Bilbo and Tsang, 2010; Bouret, 2010b; Naef et al., 2008, 2011; Naef and Woodside, 2007; Sullivan et al.,

2010; Tozuka et al., 2010; Vucetic et al., 2010; Walker et al., 2008; Wright et al., 2011). Since controlled, experimental dietary manipulation combined with the required intensive behavioral testing of offspring is not possible in humans, it is necessary to use animal models to examine the effects of specific models of maternal over nutrition with and without dietary intervention on offspring development and behavior.

Human epidemiological (Dabelea, 2007; Solomons, 2009; Wadhwa et al., 2009) and animal studies (Bautista et al., 2008; Bouret, 2010a; Han et al., 2004; Nijland et al., 2008; Nuyt and Alexander, 2009; Symonds et al., 2009; Taylor and Poston, 2007; Warner and Ozanne, 2010) demonstrate that the periconceptual, fetal and early post-natal nutritional environments modify the development of offspring physiological systems including cardiovascular, metabolic and endocrine function. These observations have led to the concept of a nutritional basis for the developmental origins of adult disease (Armitage et al., 2004; Warner and Ozanne, 2010). Developmental programming of offspring resulting in metabolic disorders or obesity can occur following either maternal under-nutrition (da Silva et al., 2011; Desai et al., 2007; Hyatt

* Corresponding author. Tel.: +52 55 5487 0900x2417; fax: +52 55 5655 9859.
E-mail address: zamgon@unam.mx (E. Zambrano).

et al., 2011; Sebert et al., 2010; Zambrano et al., 2006) or over-nutrition (Bayol et al., 2010; Wright et al., 2011; Zambrano et al., 2010). We have recently reported developmental programming effects of pre and/or postnatal protein restriction in rat offspring showing reduced motivation, impaired learning and decreased thigmotaxis at adult age (Reyes-Castro et al., 2011a,b; Torres et al., 2010). However, there are few data on the developmental programming effects of maternal obesity and accompanying excess nutrient intake which are becoming major concerns since more than 60% of childbearing age women in developed countries are overweight (King, 2006).

We recently reported on the potential of dietary intervention to modify offspring metabolic outcomes resulting from maternal obesity and HFD prior to pregnancy (Zambrano et al., 2010). In the present study we wished to determine if dietary intervention, i.e. returning the dam from a HFD to a normal diet, at different periconceptional periods would influence offspring behavioral effects. We hypothesized that in male offspring (1) maternal HFD would negatively impact aspects of anxiety related behavior, exploration, learning and motivation behaviors and (2) dietary intervention would ameliorate some of these negative outcomes in a manner dependent on the timing of the dietary recuperation. Four groups of weanling female rats were administered either control diet (CTR – 5% calories from fat), a high fat diet (HFD – 25% calories from fat) from postnatal day (PND) 21 through pregnancy and lactation (MO group), the HFD during PND's 21–90 followed by CTR diet during pregnancy and lactation (pre-gestation (PG) dietary intervention group) and the HFD from PND 21 to 120 followed by CTR diet during pregnancy and lactation (gestation (G) dietary intervention group). Male offspring behavior was assessed to determine HFD effects on anxiety, exploration, learning, and motivation and offspring improvement by maternal dietary intervention.

2. Methods

2.1. Animal care and use

2.1.1. Subjects used to produce the dams for the pregnancies studied

Female albino Wistar rats were born and maintained in the colony of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ), Mexico City, Mexico: an Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) International accredited facility. All procedures were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the INNSZ, Mexico City, Mexico. Subjects were housed in a light-controlled environment (lights on from 07:00 to 19:00 h at 22–23 °C) and fed normal laboratory chow (Zeigler Rodent RQ 22-5, USA) containing 22.0% protein, 5.0% fat, 31.0% polysaccharide, 31.0% simple sugars, 4.0% fiber, 6.0% minerals and 1.0% vitamins (w/w), energy 4.0 kcal g⁻¹ (0.2 kcal g⁻¹ from fat). Between 14 and 16 weeks of age (average weight 220 ± 20 g), females were bred with a non-litter mate proven male breeder. Dams delivered naturally at term and on postnatal day 2 litters were culled to 10 pups maintaining as near a 1:1 ratio of males and females.

2.2. Experimental dams

At weaning (PND 21), the prospective mothers were randomly assigned to either a control (CTR; n = 12) diet that received laboratory chow or a maternal obesity diet (MO; n = 36) – a high fat diet containing 23.5% protein, 20.0% animal lard, 5.0% fat, 20.2% polysaccharide, 20.2% simple sugars, 5.0% fiber, 5.0% mineral mix, 1.0% vitamin mix (w/w), energy 4.9 kcal g⁻¹ (1.23 kcal g⁻¹ from animal lard and fat). Only one female from any one litter was assigned to a group. At PND 90, 1 month before breeding, 12 MO females were assigned at random to the dietary intervention (DINT) pre-gestation group and placed back on CTR diet for the rest of the study, i.e. before and during pregnancy and lactation. At PND 120 all groups were bred and the day spermatozoa were present in a vaginal smear designated as day of conception. At this time 12 MO females were assigned at random to the DINT group during gestation (G) and switched to CTR diet for the rest of the study, i.e. pregnancy and lactation. The other 3 groups were fed their pre-pregnancy diet throughout pregnancy and lactation (see Table 1 for groups). At 19 days of gestation 6 dams from each of the 4 groups were euthanized to collect serum for corticosterone measurements. All remaining dams (6 per group) delivered spontaneously. The day of delivery was considered as PND 0. Food and water were available *ad libitum*. Pregnant and lactating rats were weighed every day through pregnancy and until pups were removed at weaning.

2.3. Maintenance of offspring

Litter size and pup weight were recorded at birth. Ano-genital distance, anterior–posterior abdominal distance and head diameter were measured with calipers. Our published data indicate that ano-genital distance is 1.67 ± 0.13 mm (n = 291 pups from 43 litters; mean ± SEM) in female pups and 3.26 ± 0.22 mm (n = 252 pups from 43 litters) in males at birth (Zambrano et al., 2005a). Since a value of 2.5 mm is more than 2 SDs from the mean of either group, sex was judged according to whether the ano-genital distance was >2.5 mm for males. To ensure homogeneity of offspring evaluated, all litters studied were adjusted to 10 pups per dam. The sex ratio was maintained as close to 1:1 as possible. Pups continued to be weighed every week.

2.4. Elevated plus maze (EPM)/open field

Two weeks prior to all behavioral testing, a reverse light cycle was implemented (lights off at 7 a.m. and on at 7 p.m.) with testing occurring during the dark phase. Subjects were assessed 7 days a week at the same time of the dark cycle for each subject between 8 a.m. and 4 p.m. At PND 75 six male unrelated naïve subjects per treatment group were tested. The specifications of data collection, the EPM and the open field apparatus have been described in detail (Reyes-Castro et al., 2011a).

2.5. Operant conditioning

On PND 80 six unrelated male offspring from different litters per diet group were tested in operant chambers (E10-10TC, Coulbourn-Instruments, PA, USA) as previously described (Reyes-Castro et al., 2011b). Two weeks prior to onset of operant training offspring were placed on water deprivation for 23 h/day with 1 h of free access. This continued throughout training and testing with the 1 h of free access immediately following behavioral sessions. For each trial the lever was extended until pressed, after which the subject was allowed 120 s to approach the reward magazine and respond with a nose poke. The registration of the nose poke into the reward magazine by the photocell receptors started the feeding for 10 s. Each trial was followed by an inter-trial interval of 5 s during which the lever was retracted. FR-1 conditioning was complete when subjects earned 20 reinforcements during a 15-min session. After all subjects reached this criterion, they were introduced to a FR-5 schedule with the identical performance criteria as for the FR-1 schedule albeit with 5 responses required per trial.

2.6. Progressive ratio testing

Following operant conditioning, each subject commenced progressive ratio testing for 10 days. In the progressive ratio schedule, an additional lever press is required for all subsequent reinforcements for the first eight reinforcements (progressive ratio + 1). For instance, one press for the first reinforcement and four presses for the fourth reinforcement. Following every eighth reinforcement, the response increment doubles and hence the number of lever presses required to obtain successive sucrose reinforcements was as followed: progressive ratio + 1 = 1, 2, ..., 8; progressive ratio + 2 = 10, 12, ..., 24; progressive ratio + 4 = 28, 32, ..., 56; progressive ratio + 8 = 64, 72, ..., 120; progressive ratio + 16 = 136, 152, ... etc. Progressive ratio sessions were 30 min in length.

2.7. Free sucrose consumption

To assess sucrose consumption behavior, subjects were given direct access to bottled sucrose solution (7%) for 30 min in the familiar colony room 1 day after the last progressive ratio session. For this evaluation subjects were single caged and sucrose consumption was calculated by subtraction of the bottle weight at the end of the session from the initial weight. This procedure was performed on 3 consecutive days.

2.8. Corticosterone measurements

In dams at 19 days of gestation and in the male offspring on PND 110, subjects were sacrificed by decapitation and blood samples taken from the neck to determine corticosterone serum levels. Blood samples were centrifuged at 4 °C for 15 min at 3500 rpm to remove red blood cells and serum stored at -20 °C until all samples were analyzed. Corticosterone serum levels were determined by radioimmunoassay using a commercial rat kit, DPC Coat-a-count (TKR1) from Diagnostic Products (Los Angeles, CA, USA). Intra- and inter-assay variability was <6% and <7%. The kit was used in accordance with manufacturer's instructions and samples were measured in duplicate.

2.9. Statistical analyses

All data are presented as Mean ± SEM, alpha level was set at 0.05. Behavioral endpoints and corticosterone levels were analyzed by ANOVA with between-subject factor of early life manipulation (maternal diet during the different periods). Post hoc analyses were performed by Tukey test using Sigma Stat 3.5.

Table 1
Experimental groups.

Groups	Maternal diet				Offspring diet
	PND 21–90	PND 90–120	Pregnancy	Lactation	
Control (CTR)	Control	Control	Control	Control	Control
Maternal obesity (MO)	High fat	High fat	High fat	High fat	Control
Pre-gestational dietary intervention (PG)	High fat	Control	Control	Control	Control
Gestational dietary intervention (G)	High fat	High fat	Control	Control	Control

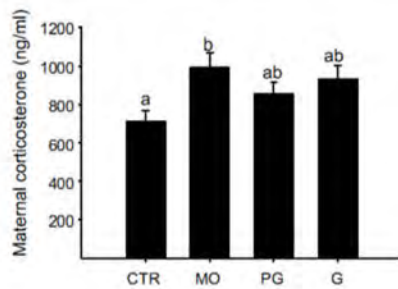


Fig. 1. Maternal serum corticosterone levels at 19 days gestation. Mean ± SEM, n = 6 dams. Data not sharing a letter are statistically different, $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Maternal corticosterone

Maternal corticosterone was higher at 19 days gestation in MO than CTR dams (Fig. 1, $p < 0.05$) with intermediate levels in the PG and G which did not reach significance.

3.2. Elevated plus maze

On PND 75 male offspring were administered the EPM to measure anxiety related behaviors. Offspring displayed no differences in the number of entries, time spent or distance traveled in the open arms, or total distance traveled (Fig. 2A–D).

3.3. Open field

Analyses of behavioral endpoints in the open field test revealed differences in experimental offspring. The MO and G offspring had increased border zone entries compared to CTR offspring (Table 2, $p < 0.05$). The G offspring had increased center zone entries versus CTR and increased center zone distance traveled compared to CTR and PG offspring (Table 2, $p < 0.05$). No differences were found for total distance, border zone time, border zone distance, and center zone time (Table 2).

3.4. Operant conditioning and progressive ratio

In offspring initial exposure to the operant chamber revealed differences in the number of sessions before approach and response to the reinforcement contingent lever. The MO, PG and G offspring required more sessions to respond versus the CTR offspring (Fig. 3A, $p < 0.05$). For fixed ratio 1 schedule of reinforcement (FR-1), group differences were determined for the number of sessions before

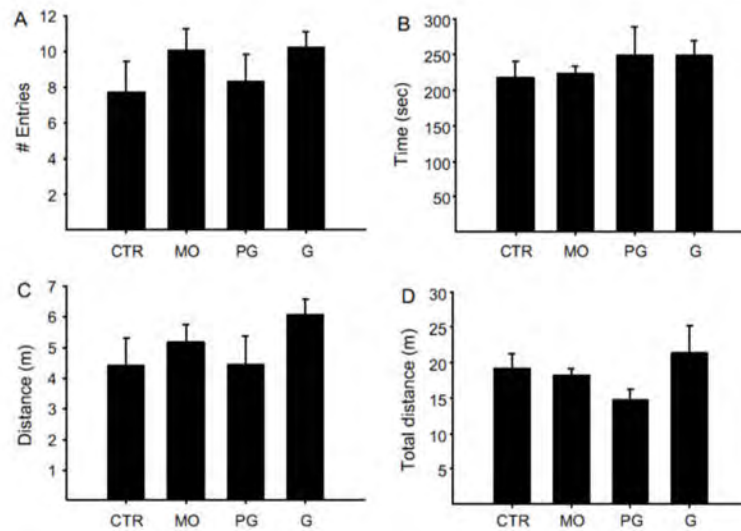
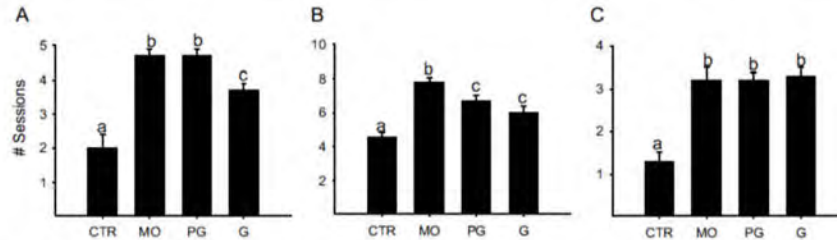
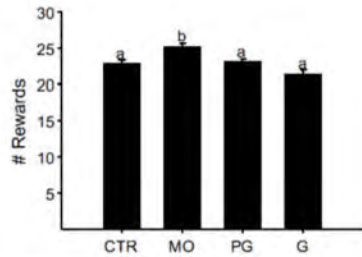


Fig. 2. Elevated plus maze endpoints. (A) Open arm entries, (B) open arm time (s), (C) open arm distance traveled (m), (D) total distance traveled (m). Mean ± SEM, n = 6 from different litter. Data not sharing a letter are statistically different, $p < 0.05$.

Table 2
Open field.

Group	Total distance	Border zone entries	Border zone time	Border zone distance	Center zone entries	Center zone time	Center zone distance
CTR	44.3 ± 4.8	12.3 ± 1.7 ^a	519 ± 45.7	39.1 ± 4.2	11.6 ± 1.9 ^c	81 ± 45.7	5.2 ± 0.9 ^{cd}
MO	56.6 ± 10.8	22.3 ± 2.9 ^b	539 ± 6.0	48.7 ± 10.2	21.3 ± 2.9 ^{ab}	61 ± 5.9	7.9 ± 0.9 ^{ab}
PG	50.5 ± 5.0	16.3 ± 2.4 ^{ab}	547 ± 9.3	43.8 ± 4.1	15.8 ± 2.5 ^{ab}	53 ± 9.3	6.6 ± 1.2 ^a
G	48.5 ± 4.5	25 ± 6.2 ^b	461 ± 17.4	36.5 ± 3.2	25.3 ± 2.6 ^b	139 ± 17.4	12.0 ± 1.6 ^b

**Fig. 3.** (A) Number of sessions required for offspring to press the operant lever for initial positive reinforcement. (B) Number of sessions required for offspring to attain FR-1 performance criterion. (C) Number of sessions required for offspring to attain FR-5 performance criterion. Mean ± SEM, n = 6 pups. Data not sharing a letter are statistically different, $p < 0.05$.**Fig. 4.** Number of rewards received during progressive ratio sessions. Mean ± SEM, n = 6 pups. Data not sharing a letter are statistically different, $p < 0.05$.

offspring attained criterion. The MO, PG and G offspring all required more sessions to attain performance criterion with the MO group requiring the most sessions (Fig. 3B, $p < 0.05$). Fixed ratio 5 schedule of reinforcement (FR-5) shows MO, PG and G offspring all required more session to reach performance criterion versus CTR offspring (Fig. 3C, $p < 0.05$). Effects on motivation as assessed by progressive ratio tasks show increased responding in MO offspring compared to CTR, PG and G groups (Fig. 4, $p < 0.05$).

3.5. Free sucrose consumption

No overall treatment effect was determined for free access to 7% sucrose during three 30 min sessions (Table 3).

3.6. Offspring corticosterone

Corticosterone male serum levels were measured on PND 110. The MO offspring show decreased corticosterone levels compared

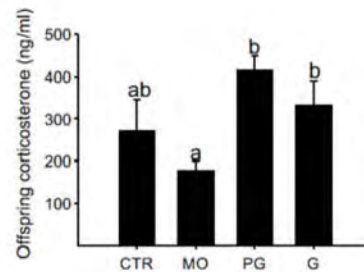
Table 3
7% sucrose consumption during 30 min (average of 3 days).

	CTR	MO	PG	G	ANOVA
(ml)	18.4 ± 0.3	17.3 ± 0.3	18.5 ± 0.3	18.0 ± 0.3	$P = 0.051$

to the PG and G offspring but not versus CTR offspring (Fig. 5, $p < 0.05$).

4. Discussion

Developmental exposure to environmental challenges in offspring can influence various aspects of behavior. In a model of maternal obesity in the rat (Zambrano et al., 2010), we sought to determine the behavioral effects in male offspring born to dams administered a HFD from PND 21 through pregnancy and lactation (maternal obesity, MO group), HFD from PND 21 to 90 and switched to control diet 1 month before mating and during pregnancy and lactation (pre-gestation dietary intervention, PG group) and from PND 21 to 120 but not during pregnancy and lactation (gestational dietary intervention, G group). The different windows of HFD regimens administered produced physiological differences in the mothers (Zambrano et al., 2010), of particular importance, maternal corticosterone serum levels at 19 days of gestation were increased in the MO group but to a lesser degree in the PG or G groups. Increased maternal corticosterone has been demonstrated in many situations that result in developmental programming of offspring by altered maternal nutrition and may constitute a common feature that explains some of the similarities in outcomes from

**Fig. 5.** Offspring corticosterone serum levels. Mean ± SEM, n = 6 from different litter. Data not sharing a letter are statistically different, $p < 0.05$.

different challenges (Cottrell and Seckl, 2009; Langley-Evans, 2009; Zambrano et al., 2005b; Guzman et al., 2006).

4.1. Anxiety related behavior and exploratory effects

Consistent with our findings here, anxiolytic effects in offspring following early postnatal overfeeding in male and female offspring (Spencer and Tilbrook, 2009) and following maternal HFD during lactation in male offspring have previously been reported (Wright et al., 2011). Those studies demonstrated that raising rats in small litters (Spencer and Tilbrook, 2009) or dams fed a cafeteria diet during pre-gestation, gestation and/or lactation (Wright et al., 2011) induces obesity in offspring and reduces anxiety in the EPM and the open field. Additionally, chronic consumption of a HFD during pregnancy causes perturbations in the serotonergic system, such as increased expression of tryptophan hydroxylase 2 and serotonin 1A receptor in the rostral raphe nucleus, and increases anxiety-like behavior in rhesus monkey offspring (Sullivan et al., 2010).

In this study the anxiolytic effects were not apparent in the experimental offspring during EPM but were observed during the open field test. These inconsistent behavioral responses in the EPM and open field tests are not surprising since studies indicate that behavioral tests that rely on unconditioned responses assess different aspects of affect and that emotional reactivity is multidimensional (Ramos, 2008; Ramos et al., 2008; Trullas and Skolnick, 1993; Vendruscolo et al., 2003). A current review contends that the EPM, open field apparatus and the light/dark box tests should be administered concomitantly to more adequately assess affect since time and/or sequence of test administration can influence outcomes (Ramos, 2008). One potential effect of testing sequentially across days is that effects are reduced as testing progresses (Ramos, 2008). However, here we report negative results in the first task administered (EPM) and positive results in the subsequent task (open field) which makes the preceding argument less likely. Alternatively, inconsistent results obtained across tests may be due to construct differences between tests or to uncontrolled, intra-individual fluctuations in behavior (Ramos, 2008).

4.2. Learning effects

During FR-1 and FR-5 operant conditioning MO, PG and G offspring displayed impaired learning. So in experimental offspring, maternal dietary intervention did not prevent these particular cognitive deficiencies. In support of our findings in the MO group, previous studies report hippocampal brain derived neurotrophic factor is decreased along with hippocampal neurogenesis and impairment in spatial learning in mice offspring exposed to a HFD during pregnancy and lactation (Tozuka et al., 2009, 2010). It should be noted that maternal dietary intervention at either period, 1 month before pregnancy or at the beginning of pregnancy, did not prevent learning impairment suggesting that maternal diet long-term prior to conception is critical for male development.

We have previously measured elevated corticosterone, estradiol, testosterone (Zambrano et al., 2005b) and progesterone (Guzman et al., 2006), concentrations near term (19 days gestation) in prenatal protein restricted rat dams with subsequent cognitive impairment in offspring (Reyes-Castro et al., 2011b, 2012). In the present study maternal corticosterone levels were increased in MO dams and marginally, though not significantly, increased in the PG and G dams. Maternal steroids can cross the placenta, and such exposure to transplacentally acquired androgens and glucocorticoids in fetal life can result in developmental perturbations which could have a role in the current behavioral findings since human studies report impairment of spatial learning ability in males exposed to excess levels of androgens *in utero* (Meyer-Bahlburg, 2011; Puts et al., 2008). There is also abundant

evidence of excess levels of glucocorticoids *in utero* impairing brain development and later behavior in humans and animal models (Antonow-Schlorke et al., 2001, 2003; French et al., 2004; Johnson et al., 1981; Karemaker et al., 2006, 2008; Matthews, 2001; Rodríguez et al., 2011; Seckl, 2008; Szuran et al., 2000; Uno et al., 1990, 1994; Weinstock, 2008) which could explain the cognitive deficits demonstrated in this study.

4.3. Motivation effects

During motivation assessment, MO offspring display increased motivation. In this context, dietary intervention normalized motivation in male PG and G offspring. The increased motivation displayed by the MO offspring is consistent with models showing increased appetitive and/or consummatory drive following maternal or early life over nutrition (Chang et al., 2008; Desai et al., 2007; Sebert et al., 2009). Similar to the MO offspring outcomes in this study, rats born to dams fed a junk food diet during gestation and lactation develop hyperphagia and a preference for fatty, sugary and salty foods over protein-rich foods compared to offspring fed a balanced chow diet prior to weaning or during lactation alone (Bayol et al., 2008). In the present study, effects of maternal HFD on offspring sucrose consumption behavior were measured there was no overall effect of perinatal diet, so the influence of consummatory behavior on progressive ratio (motivation) behavior is not applicable.

5. Conclusions

Maternal HFD administration produces an altered behavioral phenotype in male offspring. Dietary intervention recuperated or ameliorated certain indices in dams and offspring. In dams, corticosterone levels were reduced in the PG and G groups to between CTR and MO levels. However effects on offspring learning could still have been affected by the increased levels of maternal prenatal corticosterone as all experimental offspring displayed learning impairment. Prenatal exposure to increased levels of glucocorticoids changes hypothalamic pituitary adrenal axis function as well as associated receptors expression levels [for review see (Kapoor et al., 2008)]. Normal levels of motivation were restored by PG and G intervention. Additionally during exploratory behaviors, PG intervention prevented the increased exploration behavior displayed by the MO and G offspring in the open field. These findings show the importance of optimizing maternal diet and avoiding the complication of obesity. It also holds out the hope that recuperation of the diet prior to pregnancy can have beneficial long-term effects.

Acknowledgements

L.A. Reyes-Castro and G.L. Rodríguez-González are graduate students from Doctorado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México and are recipients of CONACyT fellowship. This work was supported by Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT 155166), México and NIH HD 21350.

References

- Antonow-Schlorke, I., Kuln, B., Muller, T., Schubert, H., Sliwka, U., Nathanielsz, P.W., Schwab, M., 2001. Antenatal betamethasone treatment reduces synaptophysin immunoreactivity in presynaptic terminals in the fetal sheep brain. *Neurosci. Lett.* 297, 147–150.
- Antonow-Schlorke, I., Schwab, M., Li, C., Nathanielsz, P.W., 2003. Glucocorticoid exposure at the dose used clinically alters cytoskeletal proteins and presynaptic terminals in the fetal baboon brain. *J. Physiol.* 547, 117–123.
- Armitage, J.A., Khan, I.Y., Taylor, P.D., Nathanielsz, P.W., Poston, L., 2004. Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional

- imbalance: how strong is the evidence from experimental models in mammals? *J. Physiol.* 561, 355–377.
- Bautista, C.J., Boeck, L., Larrea, F., Nathanielsz, P.W., Zambrano, E., 2008. Effects of a maternal low protein isocaloric diet on milk leptin and progeny serum leptin concentration and appetitive behavior in the first 21 days of neonatal life in the rat. *Pediatr. Res.* 63, 358–363.
- Bayol, S.A., Simbi, B.H., Bertrand, J.A., Stickland, N.C., 2008. Offspring from mothers fed a 'junk food' diet in pregnancy and lactation exhibit exacerbated adiposity that is more pronounced in females. *J. Physiol.* 586, 3219–3230.
- Bayol, S.A., Simbi, B.H., Fowkes, R.C., Stickland, N.C., 2010. A maternal junk food diet in pregnancy and lactation promotes nonalcoholic fatty liver disease in rat offspring. *Endocrinology* 151, 1451–1461.
- Bilbo, S.D., Tsang, V., 2010. Enduring consequences of maternal obesity for brain inflammation and behavior of offspring. *FASEB J.* 24, 2104–2115.
- Bouret, S.G., 2010a. Development of hypothalamic neural networks controlling appetite. *Forum Nutr.* 63, 84–93.
- Bouret, S.G., 2010b. Role of early hormonal and nutritional experiences in shaping feeding behavior and hypothalamic development. *J. Nutr.* 140, 653–657.
- Chang, G.Q., Gaysinskaya, V., Karatayev, O., Leibowitz, S.F., 2008. Maternal high-fat diet and fetal programming: increased proliferation of hypothalamic peptide-producing neurons that increase risk for overeating and obesity. *J. Neurosci.* 28, 12107–12119.
- Cottrell, E.C., Seckl, J.R., 2009. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of adult disease. *Front Behav. Neurosci.* 3, 19.
- da Silva, L.N., Gaspar, de, M.E., Cottini Fonseca, P.M., Firmino Nogueira, N.J., Marth, R.A., de, O.E., Cristina, L.P., 2011. Early weaning causes undernutrition for a short period and programmes some metabolic syndrome components and leptin resistance in adult rat offspring. *Br. J. Nutr.* 105, 1405–1413.
- Dabelea, D., 2007. The predisposition to obesity and diabetes in offspring of diabetic mothers. *Diabetes Care* 30 (Suppl. 2), S169–S174.
- Desai, M., Babu, J., Ross, M.G., 2007. Programmed metabolic syndrome: prenatal undernutrition and postweaning overnutrition. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293, R2306–R2314.
- French, N.P., Hagan, R., Evans, S.F., Mullan, A., Newnham, J.P., 2004. Repeated antenatal corticosteroids: effects on cerebral palsy and childhood behavior. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 190, 588–595.
- Guzman, C., Cabrera, R., Cardenas, M., Larrea, F., Nathanielsz, P.W., Zambrano, E., 2006. Protein restriction during fetal and neonatal development in the rat alters reproductive function and accelerates reproductive ageing in female progeny. *J. Physiol.* 572, 97–108.
- Han, H.C., Austin, K.J., Nathanielsz, P.W., Ford, S.P., Nijland, M.J., Hansen, T.R., 2004. Maternal nutrient restriction alters gene expression in the ovine fetal heart. *J. Physiol.* 558, 111–121.
- Hyatt, M.A., Gardner, D.S., Sebert, S., Wilson, V., Davidson, N., Nigmatullina, Y., Chan, L.L., Budge, H., Symonds, M.E., 2011. Suboptimal maternal nutrition, during early fetal liver development, promotes lipid accumulation in the liver of obese offspring. *Reproduction* 141, 119–126.
- Johnson, J.W., Mitzner, W., Beck, J.C., London, W.T., Sly, D.L., Lee, P.A., Khouzami, V.A., Cavalieri, R.L., 1981. Long-term effects of betamethasone on fetal development. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 141, 1053–1064.
- Kapoor, A., Petropoulos, S., Matthews, S.G., 2008. Fetal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis function and behavior by synthetic glucocorticoids. *Brain Res. Rev.* 57, 586–595.
- Karemaker, R., Heijnen, C.J., Veen, S., Baerts, W., Samsom, J., Visser, G.H., Kavelaars, A., van Doornen, L.J., van, B.F., 2006. Differences in behavioral outcome and motor development at school age after neonatal treatment for chronic lung disease with dexamethasone versus hydrocortisone. *Pediatr. Res.* 60, 745–750.
- Karemaker, R., Kavelaars, A., ter, W.M., Tersteeg-Kampman, M., Baerts, W., Veen, S., Samsom, J.F., Visser, G.H., van, B.F., Heijnen, C.J., 2008. Neonatal dexamethasone treatment for chronic lung disease of prematurity alters the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and immune system activity at school age. *Pediatrics* 121, e870–e878.
- King, J.C., 2006. Maternal obesity, metabolism, and pregnancy outcomes. *Annu. Rev. Nutr.* 26, 271–291.
- Langley-Evans, S.C., 2009. Nutritional programming of disease: unravelling the mechanism. *J. Anst.* 215, 36–51.
- Matthews, S.G., 2001. Antenatal glucocorticoids and the developing brain: mechanisms of action. *Semin. Neonatol.* 6, 309–317.
- Meyer-Bahlburg, H.F., 2011. Brain development and cognitive, psychosocial, and psychiatric functioning in classical 21-hydroxylase deficiency. *Endocr. Dev.* 20, 88–95.
- Naef, L., Moquin, L., Dal, B.G., Giros, B., Gratton, A., Walker, C.D., 2011. Maternal high-fat intake alters presynaptic regulation of dopamine in the nucleus accumbens and increases motivation for fat rewards in the offspring. *Neuroscience* 176, 225–236.
- Naef, L., Srivastava, L., Gratton, A., Hendrickson, H., Owens, S.M., Walker, C.D., 2008. Maternal high fat diet during the perinatal period alters mesocorticolimbic dopamine in the adult rat offspring: reduction in the behavioral responses to repeated amphetamine administration. *Psychopharmacology (Berl)* 197, 83–94.
- Naef, L., Woodside, B., 2007. Prolactin/Leptin interactions in the control of food intake in rats. *Endocrinology* 148, 5977–5983.
- Nijland, M.J., Ford, S.P., Nathanielsz, P.W., 2008. Prenatal origins of adult disease. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 20, 132–138.
- Nuyt, A.M., Alexander, B.T., 2009. Developmental programming and hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 18, 144–152.
- Puts, D.A., McDaniel, M.A., Jordan, C.L., Breedlove, S.M., 2008. Spatial ability and prenatal androgens: meta-analyses of congenital adrenal hyperplasia and digit ratio (2D:4D) studies. *Arch. Sex Behav.* 37, 100–111.
- Ramos, A., 2008. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? *Trends Pharmacol. Sci.* 29, 493–498.
- Ramos, A., Pereira, E., Martins, G.C., Wehrmeister, T.D., Izidio, G.S., 2008. Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial. *Behav. Brain Res.* 193, 277–288.
- Reyes-Castro, L.A., Rodriguez, J.S., Rodriguez-Gonzalez, G.L., Chavira, R., Bautista, C.J., McDonald, T.J., Nathanielsz, P.W., Zambrano, E., 2011a. Pre and/or postnatal protein restriction developmentally programs affect and risk assessment behaviors in adult male rats. *Behav. Brain Res.*, doi:10.1016/j.bbr.2011.06.008.
- Reyes-Castro, L.A., Rodriguez, J.S., Rodriguez-Gonzalez, G.L., Wimmer, R.D., McDonald, T.J., Larrea, F., Nathanielsz, P.W., Zambrano, E., 2011b. Pre- and/or postnatal protein restriction in rats impairs learning and motivation in male offspring. *Int. J. Dev. Neurosci.* 29, 177–182.
- Reyes-Castro, L.A., Rodriguez, J.S., Charco, R., Bautista, C.J., Larrea, F., Nathanielsz, P.W., Zambrano, E., 2012. Maternal protein restriction in the rat during pregnancy and/or lactation alters cognitive and anxiety behaviors of female offspring. *Int. J. Dev. Neurosci.* 30, 39–45.
- Rodriguez, A., 2010. Maternal pre-pregnancy obesity and risk for inattention and negative emotionality in children. *J. Child Psychol. Psychiatry* 51, 134–143.
- Rodriguez, J.S., Zurcher, N.R., Keenan, K.E., Bartlett, T.Q., Nathanielsz, P.W., Nijland, M.J., 2011. Prenatal betamethasone exposure has sex specific effects in reversal learning and attention in juvenile baboons. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, doi:10.1016/j.ajog.2011.01.063.
- Sebert, S.P., Hyatt, M.A., Chan, L.L., Patel, N., Bell, R.C., Keisler, D., Stephenson, T., Budge, H., Symonds, M.E., Gardner, D.S., 2009. Maternal nutrient restriction between early and mid-gestation and its impact upon appetite regulation after juvenile obesity. *Endocrinology* 150, 634–641.
- Sebert, S.P., Hyatt, M.A., Chan, L.L., Vialourides, M., Fainberg, H.P., Patel, N., Sharkey, D., Stephenson, T., Rhind, S.M., Bell, R.C., Budge, H., Gardner, D.S., Symonds, M.E., 2010. Influence of prenatal nutrition and obesity on tissue specific fat mass and obesity-associated (FTO) gene expression. *Reproduction* 139, 265–274.
- Seckl, J.R., 2008. Glucocorticoids, developmental 'programming' and the risk of affective dysfunction. *Prog. Brain Res.* 167, 17–34.
- Solomons, N.W., 2009. Developmental origins of health and disease: concepts, caveats, and consequences for public health nutrition. *Nutr. Rev.* 67 (Suppl. 1), S12–S16.
- Spencer, S.J., Tilbrook, A., 2009. Neonatal overfeeding alters adult anxiety and stress responsiveness. *Psychoneuroendocrinology* 34, 1133–1143.
- Sullivan, E.L., Grayson, B., Takahashi, D., Robertson, N., Maier, A., Betha, C.L., Smith, M.S., Coleman, K., Grove, K.L., 2010. Chronic consumption of a high-fat diet during pregnancy causes perturbations in the serotonergic system and increased anxiety-like behavior in nonhuman primate offspring. *J. Neurosci.* 30, 3826–3830.
- Sullivan, E.L., Smith, M.S., Grove, K.L., 2011. Perinatal exposure to high-fat diet programs energy balance, metabolism and behavior in adulthood. *Neuroendocrinology* 93, 1–8.
- Symonds, M.E., Sebert, S.P., Hyatt, M.A., Budge, H., 2009. Nutritional programming of the metabolic syndrome. *Nat. Rev. Endocrinol.* 5, 604–610.
- Szuran, T.F., Pliska, V., Pokorny, J., Wezel, H., 2000. Prenatal stress in rats: effects on plasma corticosterone, hippocampal glucocorticoid receptors, and maze performance. *Physiol. Behav.* 71, 353–362.
- Taylor, P.D., Poston, L., 2007. Developmental programming of obesity in mammals. *Exp. Physiol.* 92, 287–298.
- Torres, N., Bautista, C.J., Tovar, A.R., Ordáz, G., Rodríguez-Cruz, M., Ortiz, V., Granados, O., Nathanielsz, P.W., Larrea, F., Zambrano, E., 2010. Protein restriction during pregnancy affects maternal liver lipid metabolism and fetal brain lipid composition in the rat. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298, E270–E277.
- Tozuka, Y., Kumon, M., Wada, E., Onodera, M., Mochizuki, H., Wada, K., 2010. Maternal obesity impairs hippocampal BDNF production and spatial learning performance in young mouse offspring. *Neurochem. Int.* 57, 235–247.
- Tozuka, Y., Wada, E., Wada, K., 2009. Diet-induced obesity in female mice leads to peroxidized lipid accumulations and impairment of hippocampal neurogenesis during the early life of their offspring. *FASEB J.* 23, 1920–1934.
- Trullas, R., Skolnick, P., 1993. Differences in fear motivated behaviors among inbred mouse strains. *Psychopharmacology (Berl)* 111, 323–331.
- Tsai, E., Shaikh, H., Robinson, S., Teoh, T.G., 2010. Obesity in pregnancy: a major healthcare issue. *Postgrad. Med. J.* 86, 617–623.
- Uno, H., Eisele, S., Sakai, A., Shelton, S., Baker, E., Dejesus, O., Holden, J., 1994. Neurotoxicity of glucocorticoids in the primate brain. *Horm. Behav.* 28, 336–348.
- Uno, H., Lohmiller, L., Thieme, C., Kemnitz, J.W., Engle, M.J., Roecker, E.B., Farrell, P.M., 1990. Brain damage induced by prenatal exposure to dexamethasone in fetal rhesus macaques. I. Hippocampus. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 53, 157–167.
- Vendruscolo, L.F., Takahashi, R.N., Bruske, G.R., Ramos, A., 2003. Evaluation of the anxiolytic-like effect of NK1/608, a NK1-receptor antagonist, in two rat strains that differ in anxiety-related behaviors. *Psychopharmacology (Berl)* 170, 287–293.
- Vucetic, Z., Kimmel, J., Totoki, K., Hollenbeck, E., Reyes, T.M., 2010. Maternal high-fat diet alters methylation and gene expression of dopamine and opioid-related genes. *Endocrinology* 151, 4756–4764.
- Wadhwa, P.D., Buss, C., Entringer, S., Swanson, J.M., 2009. Developmental origins of health and disease: brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms. *Semin. Reprod. Med.* 27, 358–368.

- Walker, C.D., Naef, L., d'Asti, E., Long, H., Xu, Z., Moreau, A., Azeddine, B., 2008. Perinatal maternal fat intake affects metabolism and hippocampal function in the offspring: a potential role for leptin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1144, 189–202.
- Warner, M.J., Ozanne, S.E., 2010. Mechanisms involved in the developmental programming of adulthood disease. *Biochem. J.* 427, 333–347.
- Weinstock, M., 2008. The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32, 1073–1086.
- Wright, T., Langley-Evans, S.C., Voigt, J.P., 2011. The impact of maternal cafeteria diet on anxiety-related behaviour and exploration in the offspring. *Physiol. Behav.* 103, 164–172.
- Zambrano, E., Bautista, C.J., Deas, M., Martínez-Samayoa, P.M., González-Zamorano, M., Ledesma, H., Morales, J., Larrea, F., Nathanielsz, P.W., 2006. A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. *J. Physiol.* 571, 221–230.
- Zambrano, E., Martínez-Samayoa, P.M., Bautista, C.J., Deas, M., Guillen, L., Rodríguez-González, G.L., Guzmán, C., Larrea, F., Nathanielsz, P.W., 2005a. Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *J. Physiol.* 566, 225–236.
- Zambrano, E., Martínez-Samayoa, P.M., Rodríguez-González, G.L., Nathanielsz, P.W., 2010. Dietary intervention prior to pregnancy reverses metabolic programming in male offspring of obese rats. *J. Physiol.* 588, 1791–1799.
- Zambrano, E., Rodríguez-González, G.L., Guzmán, C., García-Becerra, R., Boeck, L., Díaz, L., Menjivar, M., Larrea, F., Nathanielsz, P.W., 2005b. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J. Physiol.* 563, 275–284.