



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EVALUACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO EN RATA DE  
LOS DESCENDIENTES DE MADRES OBESAS  
INTERVENIDAS CON METFORMINA ANTES Y  
DURANTE LA GESTACIÓN.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**GABRIELA LIRA LEÓN**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX**

**2017**



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.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** M. EN C. LUCÍA CORNEJO BARRERA  
**VOCAL:** DRA. ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ  
**SECRETARIO:** DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI  
**1er SUPLENTE:** DRA. ILIANA ELVIRA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ  
**2do SUPLENTE:** DR. IGNACIO GONZÁLEZ SÁNCHEZ

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN (INNSZ)

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DR. CARLOS GUAL CASTRO

### **ASESOR DEL TEMA:**

DRA. ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ

\_\_\_\_\_

### **SUPERVISOR TÉCNICO:**

M. EN C. CARLOS ALBERTO IBÁÑEZ CHÁVEZ

\_\_\_\_\_

### **SUSTENTANTE:**

GABRIELA LIRA LEÓN

\_\_\_\_\_

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación humana y académica brindada.

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, en especial al Departamento de Biología de la Reproducción - Dr. Carlos Gual Castro por haberme permitido realizar el presente trabajo de investigación.

A la Dra. Elena Zambrano González por el apoyo brindado y a los miembros de su equipo de trabajo, en especial a: M. en C. Carlos Alberto Ibáñez Chávez, Dra. Consuelo Lomas Soria, QFB. Alejandra Hernández Rojas, Dra. Claudia J. Bautista Carbajal, Dr. Luis A. Reyes Castro, Dra. Guadalupe L. Rodríguez González, Nut. Emma M. Centurión Murillo, Dra. Diana Catalina Castro Rodríguez y Dra. Nelly Rodríguez Peña.

Al Dr. Fernando Larrea Gallo, Jefe del Departamento de Biología de la Reproducción del INCMNSZ, por el apoyo y todas las facilidades otorgadas.

A los integrantes del H. Jurado por su valiosa revisión y evaluación de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca como Ayudante de Investigador otorgada para la realización de este trabajo de tesis.

Al Newton Fund RCUK-CONACyT (Research Councils UK- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) por el financiamiento otorgado.

# ÍNDICE

Contenido	Página
Resumen.....	I
1. Introducción .....	1
1.1. Obesidad .....	1
1.2. Obesidad materna .....	5
1.3. Programación del desarrollo .....	7
1.4. Factores fisiológicos de programación por obesidad materna.....	8
1.5. Intervenciones maternas .....	9
1.6. Intervención con metformina .....	11
2. Justificación .....	14
3. Planteamiento del problema .....	15
4. Hipótesis.....	16
5. Objetivos.....	17
5.1. Objetivo general .....	17
5.2. Objetivos particulares .....	17
6. Diseño experimental.....	19
7. Métodos.....	21
7.1. Animales experimentales .....	21
7.2. Dietas administradas .....	21
7.3. Medición de peso corporal y determinación de ingesta .....	23
7.4. Intervención con metformina de las hembras F <sub>0</sub> .....	24
7.5. Apareamiento y determinación de la preñez de las hembras F <sub>0</sub> .....	24
7.6. Obtención del suero de las ratas experimentales F <sub>0</sub> y F <sub>1</sub> .....	25
7.7. Extracción de tejido adiposo .....	26
7.8. Histología del tejido adiposo de las crías macho F <sub>1</sub> (110 d) .....	27
7.9. Química sanguínea .....	28
7.10. Determinación de hormonas .....	31
7.11. Métodos estadísticos .....	33

8. Resultados.....	37
<b><i>Madres experimentales F<sub>0</sub></i></b> .....	37
8.1. Crecimiento materno F <sub>0</sub> .....	37
8.2. Parámetros obtenidos durante la gestación y lactancia.....	38
8.3. Parámetros obtenidos al día 21 de lactancia.....	39
<b><i>Crías F<sub>1</sub></i></b> .....	41
8.4. Parámetros obtenidos a partir de la lactancia (21 d) hasta 110 d..	41
8.5. Parámetros a los 110 días de edad.....	42
8.6. Parámetros de adiposidad a los 110 d.....	46
9. Discusión.....	50
10. Conclusión.....	64
11. Referencias.....	65
ANEXOS.....	72
TRABAJOS RELACIONADOS.....	83

# Lista de Tablas, Figuras y Ecuaciones

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de la obesidad según la OMS .....	1
<b>Tabla 2.</b> Composición nutrimental de las dietas.....	22
<b>Tabla 3.</b> Formulación de la dieta alta en grasa .....	22
<b>Tabla 4.</b> Localización del tejido adiposo extraído en las crías macho de 110 d....	26
<b>Tabla 5.</b> Peso corporal de las crías macho F <sub>1</sub> a los 0, 21 y 110 d .....	41
<b>Figura 1.</b> Tejido adiposo de rata .....	4
<b>Figura 2.</b> Esquema general del diseño experimental.....	20
<b>Figura 3.</b> Ejemplo de la observación de un <i>frotis</i> vaginal positivo para el apareamiento .....	25
<b>Figura 4.</b> Reacciones químicas empleadas en la cuantificación de glucosa en suero .....	28
<b>Figura 5.</b> Reacciones químicas empleadas en la cuantificación de colesterol en suero .....	29
<b>Figura 6.</b> Reacciones químicas empleadas en la cuantificación de triglicéridos en suero .....	30
<b>Figura 7.</b> Esquema del principio del RIA .....	31
<b>Figura 8.</b> Tamaño del adipocito de las crías macho F <sub>1</sub> a los 110 d .....	35
<b>Figura 9.</b> Ganancia de peso corporal materno (F <sub>0</sub> ) antes del apareamiento .....	37
<b>Figura 10.</b> Ganancia de peso corporal materno durante las etapas de gestación y lactancia .....	38
<b>Figura 11.</b> Metabolismo de hidratos de carbono de las madres F <sub>0</sub> a los 21 días de lactancia ~ (165d).....	39
<b>Figura 12.</b> Adiposidad de las madres F <sub>0</sub> a los 21 días de lactancia (~165 d) .....	40
<b>Figura 13.</b> Metabolismo de hidratos de carbono de las crías macho F <sub>1</sub> a los 110 d.....	42

<b>Figura 14.</b> Peso corporal e ingesta de las crías macho $F_1$ a los 110 d.....	43
<b>Figura 15.</b> Adiposidad de las crías macho $F_1$ a los 110 d.....	44
<b>Figura 16.</b> Perfil lipídico de las crías macho $F_1$ a los 110 d.....	45
<b>Figura 17.</b> Micrografías de tejido adiposo retroperitoneal de las crías macho $F_1$ a los 110 d.....	46
<b>Figura 18.</b> Área del adipocito medida en las micrografías de las crías macho $F_1$ a 110 d.....	47
<b>Figura 19.</b> Distribución del tamaño del adipocito de las crías macho $F_1$ de 110 d.....	48
<b>Figura 20.</b> Tamaño del adipocito en el percentil 95 de las crías macho $F_1$ a 110 d.....	49
<b>Ecuación 1.</b> Índice de Masa Corporal.....	1
<b>Ecuación 2.</b> Ingesta de alimento promedio (por día).....	23
<b>Ecuación 3.</b> Ingesta relativa.....	23
<b>Ecuación 4.</b> Determinación del Índice de adiposidad.....	26
<b>Ecuación 5.</b> Índice de resistencia a la insulina.....	33
<b>Ecuación 6.</b> Ancho de categoría.....	34
<b>Ecuación 7.</b> Función de densidad de probabilidad gamma.....	36
<b>Ecuación 8.</b> Estimador del parámetro de forma.....	36
<b>Ecuación 9.</b> Estimador del parámetro de escala inverso.....	36
<b>Ecuación 10.</b> Función gamma.....	36



# Abreviaturas

$\mu\text{m}^2$	micrómetros cuadrados
$^{\circ}\text{C}$	grados Celsius
$\mu\text{L}$	microlitros
<b>4-AAP</b>	4-aminoatirpirina
<b>Ac</b>	Anticuerpo
<b>ADP</b>	Adenosin difosfato
<b>Ag</b>	Antígeno
<b>AG</b>	Ácidos grasos
<b>AMP</b>	Adenosin monofosfato (por sus siglas en inglés)
<b>AMPK</b>	Proteincinasa activada por AMP (por sus siglas en inglés)
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza (por sus siglas en inglés)
<b>ARC</b>	Núcleo arcuato (por sus siglas en inglés)
<b>ATP</b>	Adenosin trifosfato (por sus siglas en inglés)
<b>C</b>	Grupo control
<b>CE</b>	Colesterol esterasa
<b>CEx</b>	Grupo control intervenido con ejercicio
<b>CINVA</b>	Comité de Investigación en Animales
<b>CMet</b>	Grupo control intervenido con metformina
<b>CO</b>	Colesterol oxidasa
<b>Cres</b>	Grupo control intervenido con resveratrol
<b>d</b>	días de edad
<b>DCyTA</b>	Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos
<b>DG</b>	Diabetes gestacional
<b>DHBS</b>	Ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenzeno sulfónico
<b>DIEB</b>	Departamento de Investigación Experimental y Bioterio
<b>DINT</b>	Grupo con intervención nutricional (por sus siglas en inglés)
<b>dL</b>	decilitros
<b>DOHaD</b>	Orígenes en el Desarrollo de la Salud y la Enfermedad (por sus siglas en inglés)
<b>DPV</b>	Diagrama de Poisson-Voronoi
<b>EE</b>	Error estándar de la media
<b>ENSANUT</b>	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
<b>F<sub>0</sub></b>	Generación parental (madres experimentales)
<b>F<sub>1</sub></b>	Primera generación filial (crías experimentales)
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration (por sus siglas en inglés)
<b>FDP</b>	Función de densidad de probabilidad
<b>g</b>	gramos
<b>G6PDH</b>	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
<b>GK</b>	Glicerol cinasa
<b>GPO</b>	Glicerofosfato oxidasa
<b>GPx</b>	Glutación peroxidasa
<b>HE</b>	Hematoxilina-Eosina

<b>HK</b>	Hexocinasa
<b>HOMA</b>	Modelo de análisis homeostático (por sus siglas en inglés)
<b>HPO</b>	Peroxidasa de rábano
<b>IA</b>	Índice de adiposidad
<b>IMC</b>	Índice de masa corporal
<b>INNCMSZ</b>	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
<b>IRI</b>	Índice de resistencia a la insulina
<b>kcal</b>	kilocaloría
<b>kg</b>	kilogramo
<b>L</b>	litro
<b>M</b>	molar
<b>MDA</b>	Malondialdehído
<b>Met</b>	Metformina
<b>mg</b>	miligramos
<b>mL</b>	mililitros
<b>mM</b>	micromolar
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado (por sus siglas en inglés)
<b>NADH</b>	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido (por sus siglas en inglés)
<b>ng</b>	nanogramos
<b>nm</b>	nanómetros
<b>OM</b>	Grupo con obesidad materna
<b>OMEx</b>	Grupo con obesidad materna intervenido con ejercicio
<b>OMMet</b>	Grupo con obesidad materna intervenido con metformina
<b>OMres</b>	Grupo con obesidad materna intervenido con resveratrol
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>p.c.</b>	peso corporal
<b>PBS</b>	Amortiguador salino de fosfato (por sus siglas en inglés)
<b>RI</b>	Resistencia a la insulina
<b>RIA</b>	Radioinmunoanálisis
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno (por sus siglas en inglés)
<b>SM</b>	Síndrome metabólico
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>TA</b>	Tejido adiposo
<b>TAR</b>	Tejido adiposo retroperitoneal
<b>TG</b>	Triglicéridos
<b>Thr</b>	Treonina
<b>U</b>	unidad de actividad enzimática
<b>UCP</b>	Proteínas desacoplantes (por sus siglas en inglés)
<b>VLDL</b>	Lipoproteínas de muy baja densidad (por sus siglas en inglés)

# RESUMEN

La obesidad representa un proceso patológico dado por factores genéticos y ambientales, que afectan a mujeres en edad reproductiva. Esto implica problemas potenciales en la descendencia de estas mujeres, ya que las alteraciones nutricionales de un individuo durante periodos críticos del desarrollo como la gestación y la lactancia pueden modificar su fisiología y metabolismo de manera permanente, de acuerdo a la hipótesis de la programación del desarrollo.

A través de modelos experimentales se ha observado que las crías de madres obesas acumulan mayor cantidad de tejido adiposo respecto a las crías control, presentando alteraciones metabólicas y fisiológicas asociadas a la obesidad. Sin embargo, los factores maternos que contribuyen a la programación aún no están claros, por ello se pretende explorar una intervención que regule el metabolismo de la glucosa con el empleo de metformina (un agente antihiper glucemiante), cuya administración materna antes y durante la gestación podría ayudar a las crías de madres obesas a no acumular de manera excesiva el tejido adiposo y disminuir alteraciones metabólicas.

Como madres experimentales se usaron ratas hembras ( $F_0$ ) recién destetadas de 21 días de edad (d), asignadas a 4 grupos experimentales, que fueron apareadas a los 120 d con machos no experimentales. El grupo Control (C) se alimentó con dieta control (4 kcal/g) y el grupo de Obesidad Materna (OM) se alimentó con dieta alta en grasa (5 kcal/g) y la mitad de cada grupo se intervino con una dosis de 300 mg de metformina/día/kg de peso corporal a partir de los 90 d y hasta el final de la gestación, dando lugar a los grupos Control intervenido con metformina (CMet) y el grupo de Obesidad Materna intervenido con metformina (OMMet). Las crías ( $F_1$ ) se asignaron al mismo grupo experimental de la madre; al destete (21 d) fueron alimentadas con dieta control hasta los 110 d, momento en el que fueron sacrificadas, obteniéndose tejido adiposo (TA) y suero. Se midió el contenido de grasa corporal, la concentración de triglicéridos (TG), colesterol y leptina, como a su vez glucosa e insulina. Posteriormente, se realizaron cortes histológicos del tejido adiposo retroperitoneal (TAR) para evaluar el tamaño del adipocito a través de un análisis estadístico de la dispersión del tamaño.

La dieta alta en grasa produjo mayor ganancia de peso corporal en las madres  $F_0$  sin cambio en los grupos intervenidos con metformina (Met). Sin embargo, al final de la lactancia, se observaron en las  $F_0$  cambios benéficos en la concentración de TG y de glucosa. Por otro lado, entre las  $F_1$  macho experimentales de 110 d, no se observaron cambios significativos en el peso corporal. No obstante, las crías macho OM tuvieron mayor índice de adiposidad (IA), en la mediana del tamaño del adipocito, las concentraciones de leptina y TG en suero, así como el índice de resistencia a la insulina (IRI) comparados con los parámetros de crías macho C. Sin embargo, la intervención materna con Met produjo tanto en los marcadores del metabolismo de lípidos como de glucosa, en donde el grupo OMMet no presentó diferencia significativa respecto al grupo OM ni al grupo C. Asimismo, se observó que el tamaño de los adipocitos en el grupo OMMet, en el percentil 95, se redujo respecto al grupo OM. En este mismo parámetro, el grupo CMet denotó diferencia significativa con respecto al grupo C. En conclusión, el uso de la Met en la madre obesa, previamente y durante el embarazo, es capaz de contrarrestar, en parte, algunos de los efectos adversos en el metabolismo de lípidos y glucosa en su descendencia macho.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Obesidad

### 1.1.1. Definición y clasificación

La obesidad es una enfermedad crónica degenerativa multifactorial, la cual se caracteriza por la acumulación y aumento del tejido adiposo corporal debido a la alta ingesta energética que se almacena en forma de grasa provocando una ganancia de peso (Gardner 2003, Sengier 2005, Weinsier et al 1998). Esto se modula por la interacción entre factores fisiológicos, genéticos, epigenéticos, sociales y ambientales.

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), el sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. Una forma simple de medir la obesidad es el índice de masa corporal (IMC), que se expresa como:

$$IMC = \frac{\text{Peso corporal (kg)}}{\text{Talla}^2 \text{ (m}^2\text{)}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Dicho parámetro se utiliza para la clasificación de la obesidad (Tabla 1), el cual se emplea frecuentemente para identificar el sobrepeso y la obesidad en adultos, tanto a nivel individual como poblacional. La OMS define el sobrepeso como un IMC igual o superior a 25, y la obesidad como un IMC igual o superior a 30.

**Tabla 1.** Clasificación de la obesidad según la OMS

Clasificación	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Riesgo asociado a la salud
Normopeso	18.5 – 24.9	Promedio
Exceso de peso	≥ 25	
Sobrepeso	25 – 29.9	Aumentado
Obesidad grado I o moderada	30 – 34.9	Aumento moderado
Obesidad grado II o severa	35 – 39.9	Aumento severo
Obesidad grado III o mórbida	≥ 40	Aumento muy severo

Aparte del IMC como parámetro de clasificación de la obesidad, encontramos otros tipos: clasificación morfométrica, clasificación histológica y clasificación etiológica.

El primer tipo se refiere a la forma del cuerpo del sujeto, entre las que se encuentran:

**Obesidad androide o central o abdominal** (en forma de manzana): el exceso de grasa se localiza preferentemente en la cara, el tórax y el abdomen. Se asocia a un mayor riesgo de dislipemia, diabetes, enfermedad cardiovascular y la mortalidad en general.

**Obesidad ginoide o periférica** (en forma de pera): la grasa se acumula básicamente en la cadera y en los muslos. Este tipo de distribución se relaciona principalmente con problemas de retorno venoso en las extremidades inferiores (varices) y con artrosis de rodilla (genoartrosis).

**Obesidad de distribución homogénea:** es aquella en la que el exceso de grasa no predomina en ninguna zona del cuerpo.

Para saber el tipo de obesidad se tiene que dividir el perímetro de la cintura entre el perímetro de la cadera. En la mujer, cuando es superior a 0.9 y en el varón cuando es superior a 1, se considera obesidad de tipo androide (Salas-Salvadó et al 2007).

En el segundo tipo de clasificación se hace énfasis en la célula del tejido graso: el adipocito, en el que su tamaño y volumen pueden variar y comprende los siguientes puntos:

**Obesidad hiperplásica:** el aumento de la grasa corporal se debe al aumento de la población de adipocitos conservando su tamaño.

**Obesidad hipertrófica:** el aumento del volumen de la grasa corporal es a expensas del aumento del tamaño de los adipocitos, en los que se almacenan TG (Hernández 2010).

El tercer tipo de clasificación es el etiológico en el que existen:

**Obesidad primaria, esencial o idiopática:** es la forma más frecuente (95%) y realmente no suele ser tan idiopática, puesto que aunque puede haber una predisposición genética, casi siempre está presente por un desbalance entre la cantidad de calorías ingeridas con la alimentación y el gasto energético.

**Obesidad secundaria:** sólo afecta a menos del 5% de la población obesa, las causas pueden ser variables, ya sea de origen endocrino, genético y por fármacos (Hernández 2010).

El sobrepeso y la obesidad son factores de riesgo para numerosas enfermedades crónicas, entre las que se incluyen la diabetes, las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Una característica clave es la obesidad abdominal, la cual constituye el principal componente del síndrome metabólico (SM).

#### 1.1.2. Tejido adiposo

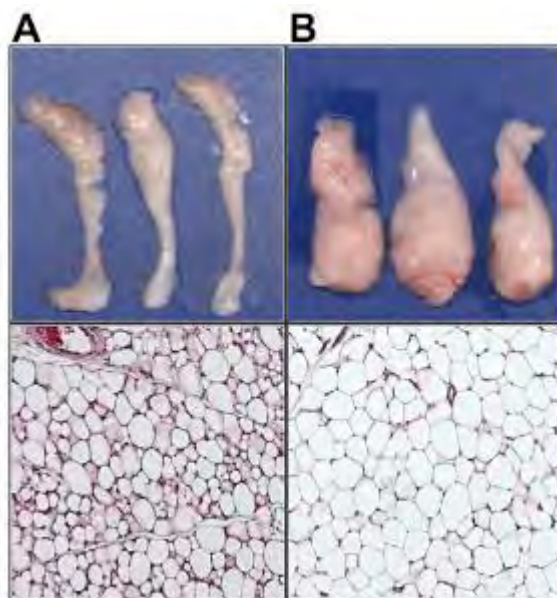
Por otro lado, el TA es un tejido conectivo laxo, cuya células denominadas adipocitos están especializadas en el almacenamiento de TG. Estas células adiposas presentan un componente estromático/vascular en el que residen los preadipocitos. Los adipocitos, con un diámetro mínimo de 30 a 40  $\mu\text{m}$  que pueden llegar a medir hasta un máximo de 150 a 160  $\mu\text{m}$  o más (Cinti 2007), son células esféricas que contienen una vacuola lipídica que representa el 95% del peso celular y que desplaza al resto de los organelos hacia la periferia.

El TA se encuentra distribuido en distintas localizaciones en el organismo humano. Estos depósitos se encuentran principalmente a escala dérmica, subcutánea, mediastínica, mesentérica, perigonadal, perirrenal y retroperitoneal. De acuerdo a las diferencias en su morfología, distribución, expresión génica y función, se distinguen dos tipos de TA, y por lo tanto, dos tipos de adipocitos diferentes que los forman:

El **tejido adiposo blanco** es el más abundante del organismo humano adulto y por lo tanto, el de mayor reservorio energético en forma de TG, provenientes de los quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) circulantes de la

alimentación y liberados de ácidos grasos (AG) durante el ayuno para proporcionar combustible a otros tejidos. Este TA blanco es un órgano productor de sustancias con acción endócrina, parácrina y autócrina (Figura 1).

El **tejido adiposo marrón (pardo)** es el encargado de la termogénesis, su color se debe por la gran cantidad de mitocondrias que posee, las cuales expresan altas cantidades de proteínas desacoplantes (UCP, por sus siglas en inglés) que producen un desacoplamiento de fosforilación oxidante, lo que produce disipación de energía en forma de calor.



**Figura 1. Tejido adiposo de rata.** **A.** Subcutáneo, en la parte superior se presenta una fotografía de muestra de este tejido, donde se observa su morfología macroscópica. En la parte inferior, se presenta una microfotografía teñida con HE observada a 10X **B.** Visceral, en la parte superior se presenta una fotografía de muestra de este tejido, donde se observa su morfología macroscópica. En la parte inferior, se observa una microfotografía teñida con HE observada a 10X (Berry et al 2013).

En el aumento de la cantidad de TA se hallan implicado dos procesos; por un lado está el aumento de tamaño de los adipocitos (hipertrofia) y por otro, el incremento en el número de adipocitos (hiperplasia), este último se realiza a partir de los preadipocitos mesenquimáticos, lo cual supone un conjunto de pasos de diferenciación en el que participa una cascada de factores de transcripción específicos. El TA visceral, en particular el de la región retroperitoneal en la rata, se ha descrito que puede aumentar su volumen tanto por hipertrofia como por hiperplasia en proporciones similares, por lo que resulta un tejido adecuado para estudiar ambos procesos (DiGirolamo et al 1998).

### 1.1.3. Síndrome metabólico

Otro factor altamente asociado a la obesidad es el SM, el cual es un conjunto de factores de origen metabólico que ocurren al mismo tiempo. Para considerar que existe el SM se deben presentar, al menos, tres de los siguientes factores: obesidad abdominal, dislipemia, hipertensión arterial y elevada, intolerancia a la glucosa o resistencia a la insulina (Fernandez-Berges et al 2011).

### 1.1.4. Factores epidemiológicos (Obesidad en mujeres en edad reproductiva)

En México, la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad en mujeres en edad reproductiva es del 73.0% (ENSANUT 2012, Nathanielsz et al 2013), lo cual representa un riesgo potencial para sus descendientes a padecer obesidad y sobrepeso. Los estudios con animales experimentales demuestran que los descendientes de madres obesas, aún alimentados con dieta control, acumulan mayor grasa corporal en la edad adulta (Shankar et al 2008, Zambrano et al 2010, Zambrano & Nathanielsz 2013).

En numerosos estudios se ha demostrado que patologías obstétricas y complicaciones del parto como diabetes gestacional (DG), hipertensión arterial y preeclampsia, infecciones, hemorragia posparto, macrosomía fetal, distocia de hombro, muerte fetal-neonatal, aumento en la tasa de cesáreas y complicaciones de la anestesia, están fuertemente vinculados tanto al exceso de peso materno antes del embarazo como a su incremento desmedido durante el mismo (Grandi et al 2012).

## 1.2. Obesidad materna

La prevalencia de la obesidad en mujeres de edad reproductiva, ha incrementado en países desarrollados y en vías de desarrollo alrededor del mundo. Estudios en humanos y animales experimentales señalan que la obesidad materna impacta negativamente en la salud de la madre y en el fenotipo de la cría, predisponiéndolos a desarrollar enfermedades crónicas a largo plazo como obesidad, dislipidemia, diabetes mellitus tipo II e hipertensión (Leddy et al 2008, Yogev 2009, Yu et al 2006).



### 1.2.1. Obesidad en la gestación y la lactancia

Particularmente, en la dieta de las embarazadas se notan alteraciones con déficit de micronutrientes y exceso de macronutrientes (ricos en grasas saturadas) que se traducen en obesidad y otras patologías asociadas (Grandi et al 2012).

La obesidad durante el embarazo representa un problema no sólo por el efecto adverso inmediato sobre la salud materna y el parto, sino también por la creciente evidencia de efectos deletéreos sobre el feto en desarrollo y alejados en la muerte fetal, con riesgos entre 1.47 y 2.07 veces más en mujeres con sobrepeso y obesidad, respectivamente, (Chu et al 2007b) hasta una mayor prevalencia de defectos congénitos asociados a obesidad materna y de patologías tardías en los hijos, como las ya mencionadas anteriormente.

#### 1.2.1.1. Diabetes gestacional

La OMS identifica a la DG, como una hiperglicemia (aumento de glucosa en sangre) que se detecta por primera vez durante el embarazo (OMS 2012). Este padecimiento no es causado por la carencia de insulina, sino a la diversa producción hormonal, de origen placentario, que se opone al efecto de la insulina desarrollando una condición denominada resistencia a la insulina, presentándose, generalmente, a partir de las 20 semanas de gestación (American Diabetes Association 2003).

La DG alcanza valores que, pese a ser superiores a los normales, son inferiores a los establecidos para diagnosticar una diabetes. Las mujeres con DG corren mayor riesgo de sufrir complicaciones durante la gestación y el parto, ya que el efecto hormonal aunado al incremento normal de peso las predisponen a padecer diabetes tipo II posterior al embarazo (Chu et al 2007a).

#### 1.2.1.2. Resistencia a la insulina

La insulina es una hormona polipeptídica secretada específicamente por las células  $\beta$  pancreáticas (Lehninger et al 2008), la cual ayuda a la regulación de la glucosa en sangre que proviene de los alimentos con el fin de transformarla en energía. Sin embargo, cuando existe una concentración de glucosa sanguínea superior a la necesaria, este

exceso es captado por las células y se transforma en los compuestos de almacenamiento, glucógeno y TG.

Pese a que se conoce muy poco de los mecanismos moleculares y celulares que causan la resistencia a la insulina (RI), este padecimiento metabólico se describe como la disminución de la eficacia de insulina en la reducción de la concentración de glucosa en sangre (Megyesi et al 1967), es decir, las células se vuelven literalmente resistentes al efecto de la insulina en ellas.

La obesidad es un factor de riesgo asociado que puede conducir a la RI, siendo ésta la precursora de la diabetes mellitus tipo II (Grandi et al 2012).

#### 1.2.1.3. Resistencia a la leptina

Otro factor asociado a la obesidad, es el incremento de la concentración de leptina circulante libre, el cual se correlaciona con el IMC y la grasa corporal (Hamed et al 2011, Hardie et al 1997). En esta situación, los efectos paradójicos del aumento de la concentración de leptina se explican en parte por una pérdida de la capacidad de señalización de los centros reguladores de la saciedad dando como resultado la resistencia a la leptina (Tessier et al 2013).

### 1.3. Programación del desarrollo

#### 1.3.1. Definición

La Programación del desarrollo se define como la respuesta de los organismos mamíferos a un estímulo específico durante un periodo crítico del desarrollo que altera el trayecto del mismo con efectos en la salud que persisten a lo largo de la vida. También se le conoce como *Orígenes en el Desarrollo de la Salud y la Enfermedad (DOHaD*, por sus siglas en inglés) (Nathanielsz et al 2013).

El estímulo puede originarse por medios endógenos (señalización hormonal) o exógenos (medio ambiente). La nutrición es un factor importante de la programación ambiental, ya que ésta puede inducir efectos permanentes en el metabolismo, crecimiento,

neurodesarrollo y procesos patológicos (hipertensión, diabetes, aterosclerosis u obesidad) durante la vida fetal e infancia temprana (Martínez 2008).

Por esta razón, los estudios en animales son una herramienta importante y necesaria para tener un mayor control sobre los factores ambientales que se desean evaluar en una determinada población siendo, en comparación con los estudios epidemiológicos, menos complejos de realizar.

### 1.3.2. Programación del desarrollo por obesidad materna

La nutrición materna durante la gestación y la lactancia es uno de los factores determinantes en el desarrollo futuro de la progenie. En efecto, se ha demostrado, a través de modelos experimentales en animales, que la alimentación alta en grasa y en particular durante el embarazo produce hiperinsulinemia materna, de la cual se ha sugerido que funcione como un estímulo programador, ya que ésta se puede asociar con la ganancia de peso de la descendencia en la vida adulta (García et al 2010).

Sin embargo, se ha descrito en experimentos con ratas Sprawn-Dowley que la descendencia de madres experimentales obesas, aún antes de alcanzar la adultez, presenta resistencia a la insulina, además de alteraciones en la señalización de la saciedad en el hipotálamo y una elevada expresión de mRNA para la leptina en el tejido adiposo (Kirk et al 2009).

## 1.4. Factores fisiológicos de Programación del desarrollo por obesidad materna

La exposición de varios factores en el desarrollo, incluyendo el estrés, la obesidad, las dietas altas en calorías y los productos químicos ambientales pueden conducir a resultados perjudiciales en la salud del descendiente (Rosenfeld 2016).

El ambiente fetal subóptimo, debido a la nutrición inadecuada, infección, anemia, hipertensión, inflamación, DB o hipoxia en la madre, expone al feto a factores hormonales, de crecimiento, citocinas o adipocinas (Martínez 2008).

## 1.5. Intervenciones maternas

Dentro de la línea de investigación de nuestro grupo de trabajo se han desarrollado y evaluado modelos de obesidad materna con tipos específicos de intervención, diseñados con el objetivo de prevenir y/o disminuir las consecuencias adversas, propiciadas por la obesidad materna, tanto en la cría como en la madre. A continuación se describen algunos de los hallazgos reportados.

### 1.5.1. Intervención nutricional

Previo al embarazo, se indujo obesidad en ratas hembra alimentadas con dieta alta en grasa desde el destete hasta el apareamiento (90 días), así como a lo largo del embarazo y la lactancia. A la par, un grupo de madres obesas cambió su dieta obesogénica por una dieta normal, la cual consumió durante un mes antes del apareamiento, clasificándolo como grupo con intervención nutricional (DINT, por sus siglas en inglés).

Se evaluó a la F<sub>1</sub> macho de 21 d, cuyos parámetros de TA, TG, leptina e insulina fueron elevados en crías OM, mientras que en las crías DINT fueron normales. A los 120 d, los parámetros de glucosa, insulina e IRI incrementaron en crías OM, mientras que en crías DINT, la glucosa se recuperó y el IRI también fue similar al grupo C. A nivel celular, en 150 d se evaluó el tamaño del adipocito presentando un mayor tamaño en el grupo OM respecto al grupo DINT, donde el tamaño fue mayor que C pero menor que OM.

En resumen, este estudio reveló indicios de que con una intervención nutricional materna previa al embarazo, los efectos adversos de la programación por obesidad materna pueden ser prevenidos parcialmente en su descendencia (Zambrano et al 2010).

### 1.5.2. Intervención con Ejercicio

Previo al embarazo, se indujo obesidad en ratas hembra alimentadas con dieta alta en grasa desde el destete hasta el apareamiento (90 días), así como a lo largo del embarazo y la lactancia. A un mes previo del apareamiento, se seleccionó al azar la mitad de hembras del grupo C junto con la mitad del grupo OM, las cuales fueron intervenidas con ejercicio (C con ejercicio, CEx; OM con ejercicio, OMEx), respetando el tipo de dieta. Se empleó una rueda para roedor, cada sesión de entrenamiento constó en correr dos

lapsos de 15 minutos, con un periodo de descanso (15 min) entre cada ejecución. Las ratas reposaban 2 días a la semana de forma no consecutiva. Antes del apareamiento, todas las ratas completaron un régimen total de 30 minutos de ejercicio por sesión, mientras que durante la gestación sólo corrieron una sesión de 15 minutos al día, y no realizaron la actividad física durante la lactancia. Se evaluaron y se analizaron los parámetros metabólicos tanto de la progenie (36 d) como de las madres (pre-gestación y final de la lactancia); las crías a partir del destete (21 d) llevaron una dieta control.

Como resultados, el ejercicio no cambió el peso materno, pero si previno completamente el aumento de TG y de forma parcial, el incremento de glucosa, insulina, colesterol y estrés oxidante, así como el aumento de corticosterona en el grupo de madres obesas. También ayudó a la recuperación de la tasa de fertilidad y, al final de la lactancia, el ejercicio revierte todas las variables metabólicas a niveles control, excepto el valor de la leptina.

Por el otro lado, el peso de las crías fue similar al nacer y a los 36 d se observó que los machos OM tuvieron niveles elevados de leptina, TG y mayor cantidad de TA en comparación con las hembras OM. En el grupo C, el ejercicio redujo en las crías la concentración de glucosa previniendo el aumento de leptina y de TG, parcialmente. En conclusión, el ejercicio materno antes y durante el embarazo tiene efectos benéficos en la función endócrina y metabólica tanto de la madre como de la cría, pese a no producirse cambios en el peso corporal de ambos (Vega et al 2015).

### 1.5.3. Intervención con el antioxidante resveratrol

Previo al embarazo, se indujo obesidad en ratas hembra alimentadas con dieta alta en grasa desde el destete hasta el apareamiento (90 días), así como a lo largo del embarazo y la lactancia. A un mes del apareamiento, se seleccionó al azar la mitad de hembras del grupo C junto con la mitad del grupo OM, las cuales fueron intervenidas con resveratrol (C con resveratrol, Cres; OM con resveratrol, OMres), respetando el tipo de dieta. Se empleó una dosis de 20 mg/día/kg de peso corporal de resveratrol antes y durante la gestación, donde las madres intervenidas no presentaron cambio alguno en el peso corporal. Se evaluó a la progenie F<sub>1</sub> de 21 d, cuyos parámetros de grasa total y TG fue

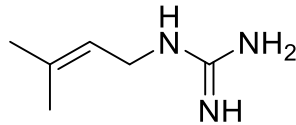
mayor con respecto al grupo C, el cual se previno totalmente en las crías OMres. Como resultados a nivel del estrés oxidante evaluado, se encontró que las crías macho OM presentaron mayor concentración de malondialdehído (MDA) en comparación al grupo C, mientras que en las crías macho OMres disminuyó; en el caso de las crías hembra los grupos Cres y OMres tuvieron menor concentración respecto a sus controles. Las hembras OM tuvieron mayor concentración de MDA en el hígado comparado con el grupo C, sin obtener cambio en los grupos intervenidos; los machos OMres tuvieron menor concentración de MDA comparado con el grupo OM. Las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) fueron menores en los machos OMres, sin obtener cambios en los demás grupos experimentales. La actividad de las enzimas antioxidantes no fue diferente en las hembras, sin embargo, la actividad de glutatión peroxidasa (GPx) en los machos OM se encontró aumentada y disminuida en el grupo OMres, mientras que la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) se encontró disminuida en el grupo OMres. En conclusión, la intervención con resveratrol en madres obesas antes y durante la gestación previene la acumulación excesiva de grasa y TG en su descendencia (Loza 2014).

De acuerdo a todo lo anterior, se visualiza que cualquier intervención previa a la gestación, durante la gestación y durante la lactancia, que se realice sobre las madres obesas tendrá algún efecto benéfico sobre su descendencia.

## **1.6. Intervención con metformina**

### **1.6.1. Origen**

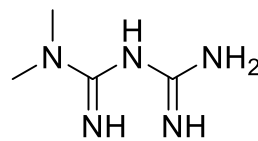
Entre los diferentes fármacos que se emplean para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II está la Met. Este compuesto sintético forma parte de la familia de las biguanidas, un grupo de fármacos que proceden de la isoprenilguanidina o galegina, un alcaloide presente en *Galega officinalis*, planta que se ha usado desde la época medieval para el tratamiento de la diabetes (Bailey & Turner 1996, Castro-Martínez et al 2014).



Estructura química de la galegina

### 1.6.2. Definición

La Met es un fármaco antidiabético de aplicación oral, cuyo papel principal es disminuir la gluconeogénesis hepática y reducir la RI. Se utiliza como tratamiento de primera línea para el manejo de la diabetes mellitus tipo II, con efectos de pérdida de peso, que ha sido aprobado para su uso en pacientes diabéticos y obesos con función renal normal y RI. En sí es un coadyuvante, ya que no se ha demostrado que induzca una pérdida de peso significativa.



Nombre IUPAC: 3-(diaminometiliden)-1,1-dimetilguanidina (metformina)

### 1.6.3. Propiedades

La Met es una molécula hidrofílica básica, cuya difusión pasiva a través de la membrana celular es muy limitada. Su absorción ocurre principalmente por el intestino delgado a través de los receptores de monoaminas de la membrana plasmática y se excreta sin cambios en la orina (Graham et al 2011).

### 1.6.4. Mecanismo de acción

Pese a que la Met ha sido utilizada por más de 30 años, su mecanismo de acción aún no está plenamente esclarecido. Se ha descrito que disminuye las concentraciones de glucosa al reducir la producción hepática de ésta y que actúa favoreciendo la sensibilidad de receptores celulares periféricos y hepáticos a la insulina, además de retardar la absorción de glucosa a nivel gastrointestinal (Pernicova & Korbonits 2014).

Durante muchos años, el blanco molecular de la Met fue elusivo hasta que en el año 2001; Zhou y colaboradores (Zhou et al 2001) reportaron que la activación de la proteincinasa activada por AMP (AMPK) está estrechamente asociada con los efectos pleiotrópicos de la metformina (Daugan et al 2016).

Con base en estudios recientes, estos efectos pleiotrópicos están relacionados a su acción dentro de las mitocondrias. De hecho, la Met se acumula en las mitocondrias a través de la interacción vía potencial de membrana mitocondrial y la carga positiva de la molécula (Foretz & Viollet 2014). Una vez dentro, la metformina inhibe al complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, dando como resultado la disminución de la concentración de ATP celular y un incremento en ambas proporciones ADP/ATP y AMP/ATP, lo que refleja un bajo nivel de energía.

La activación de AMPK conduce a las células de un estado anabólico a uno catabólico (que producen energía), cerrando las vías de consumo de ATP y restaurando el equilibrio energético celular (Viollet et al 2012). Como resultado de esta activación, la AMPK es capaz de regular *a la baja* la síntesis de glucosa, lípidos y proteínas, así como el crecimiento celular, mientras que se estimula la oxidación de AG y el consumo de glucosa (Krishan et al 2015).

#### **1.6.5. Ventajas**

La Met se caracteriza por su efecto antihiper glucemiante, es decir, sensibiliza los receptores de insulina para la captación de glucosa sin causar hipoglicemia o incremento en el peso corporal (Harris et al 2016).

En estudios recientes, se reporta a la Met como agente protector cardiovascular, antiinflamatorio, agente neuroprotector e inclusive como anticancerígeno (Daugan et al 2016).



## 2. JUSTIFICACIÓN

La prevalencia mundial de la obesidad se ha incrementado significativamente en las últimas décadas. Los posibles factores que predisponen a la obesidad son el cambio de la dieta a nivel mundial, con aumento del consumo de grasas e hidratos de carbono, disminución de la actividad física debido al trabajo sedentario, la urbanización y condiciones de la vida moderna.

La obesidad representa un proceso patológico dado por cambios en los factores socioeconómicos y el estilo de vida que influyen principalmente en el deterioro de los hábitos alimentarios de las mujeres en edad reproductiva.

En los últimos años se ha observado que la obesidad materna ha incrementado en la población mexicana. Esto implica problemas potenciales en la descendencia de estas mujeres, ya que las alteraciones nutricionales de un individuo durante periodos críticos del desarrollo como la gestación y la lactancia pueden modificar su fisiología y metabolismo de manera permanentemente, esto de acuerdo a la hipótesis de la programación del desarrollo.

Debido a que es complicado estudiar la programación en humanos, el abordaje experimental con modelos animales cobra gran importancia, ya que en ellos se pueden controlar y/o manipular las variables a estudiar durante el avance de la investigación.

Los modelos experimentales revelan que las alteraciones asociadas a la obesidad como la acumulación de grasa (hiperleptinemia), aumento en el estrés oxidante y RI, entre otros, desempeñan un papel importante en el desarrollo posnatal de los descendientes.

Dado que estos efectos adversos se desarrollan en las crías de madres obesas es necesario intervenir a nivel del metabolismo glucémico materno, el cual actúa como agente programador de la RI. Con el fin de conocer si la Met tiene un efecto en el desarrollo de los descendientes (en especial en la adiposidad).

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La obesidad materna representa un problema no sólo por el efecto adverso inmediato que tiene en la salud de la madre, sino también por los efectos que puede tener sobre su descendencia durante etapas críticas del desarrollo como el periodo prenatal y postnatal.

Las madres obesas desarrollan hijos que presentan una adiposidad excesiva, consecuencia de alteraciones metabólicas en la progenitora, principalmente. Dentro de estas alteraciones metabólicas en madres obesas, se encuentran la hiperinsulinemia, las dislipidemias y la resistencia a la insulina (Howie et al 2009, Nivoit et al 2009), entre otras.

Sin embargo, existe una mayor prevalencia de defectos congénitos asociados a la obesidad materna y de patologías tardías en los hijos, tales como obesidad, trastornos en el metabolismo de la insulina y diabetes mellitus tipo II por lo que la intervención con un antihiperglucemiante como la metformina, resulta de suma importancia para evaluar el papel del metabolismo materno de la glucosa en el fenotipo de las crías de madres obesas. De tal forma que se pueda evaluar si dicha intervención materna, previene alteraciones metabólicas, especialmente en la acumulación de tejido adiposo como cambios a nivel celular, dado que el tamaño del adipocito juega un papel fisiológicamente importante.

## 4. HIPÓTESIS

La intervención con metformina previa y durante la gestación en madres obesas prevendrá las alteraciones negativas en sus crías como la acumulación excesiva de tejido adiposo y resistencia a la insulina.

# 5. OBJETIVOS

## 5.1. Objetivo general

- Determinar el efecto en la adiposidad, así como la RI, de la progenie  $F_1$  a partir de la intervención con Met en ratas  $F_0$  obesas un mes previo de la preñez y durante la gestación.

## 5.2. Objetivos particulares

- Inducir obesidad experimental en ratas hembra *Wistar* con una dieta alta en grasa.
- Preñar a las ratas  $F_0$  obesas con un macho  $F_0$  control a los 120 d.
- Administrar oralmente Met (300 mg/día/kg de peso corporal) en las ratas  $F_0$  desde un mes previo y durante la gestación (21 días).
- En las  $F_0$  experimentales:
  - Registrar la ganancia de peso corporal durante su crecimiento, así como en las etapas de gestación y lactancia.
  - Cuantificar los parámetros bioquímicos y hormonales en suero basal al día 21 de lactancia.
  - Extraer el TA para determinar el IA.
- Obtener las crías  $F_1$  de las ratas  $F_0$  de cada grupo experimental.

- En las F<sub>1</sub> macho:
  - Registrar el peso corporal al nacimiento, durante la lactancia y a partir del destete hasta a los 110 d.
  - Determinar la ingesta de alimento diez días previos a la eutanasia.
  - Cuantificar los parámetros bioquímicos y hormonales en suero basal a los 110 d.
  - Extraer el peso del TA para determinar el IA a los 110 d.
  - Evaluar y cuantificar el tamaño del adipocito (área), a los 110 d, a través de la histología del tejido adiposo retroperitoneal (TAR) empleando la tinción hematoxilina-eosina (HE).
  
- Determinar mediante análisis estadístico si existe relación entre la intervención con Met de las F<sub>0</sub> experimentales y los parámetros lipídicos de las F<sub>1</sub> macho.

## 6. DISEÑO EXPERIMENTAL

Los animales experimentales, aprobados por el Comité de Ética en Investigación de Animales, fueron seleccionados al azar y con ello, se realizaron diversas mediciones, los datos recabados se expresan como la media aritmética  $\pm$  el error estándar de la media (EE).

Para los experimentos se usaron ratas hembra de la cepa *Wistar* ( $F_0$ ) recién destetadas (21 d), edad a la cual empezaron a alimentarse con dieta Control (alimento comercial para roedor) o con dieta alta en grasa (previamente preparada en el laboratorio). Ambos grupos, a los 120 días de edad, se aparearon con machos no experimentales, conservando el mismo tipo de dieta dada desde el destete, durante la gestación y hasta el final de la lactancia, dando origen a cuatro grupos experimentales que se describen a continuación:

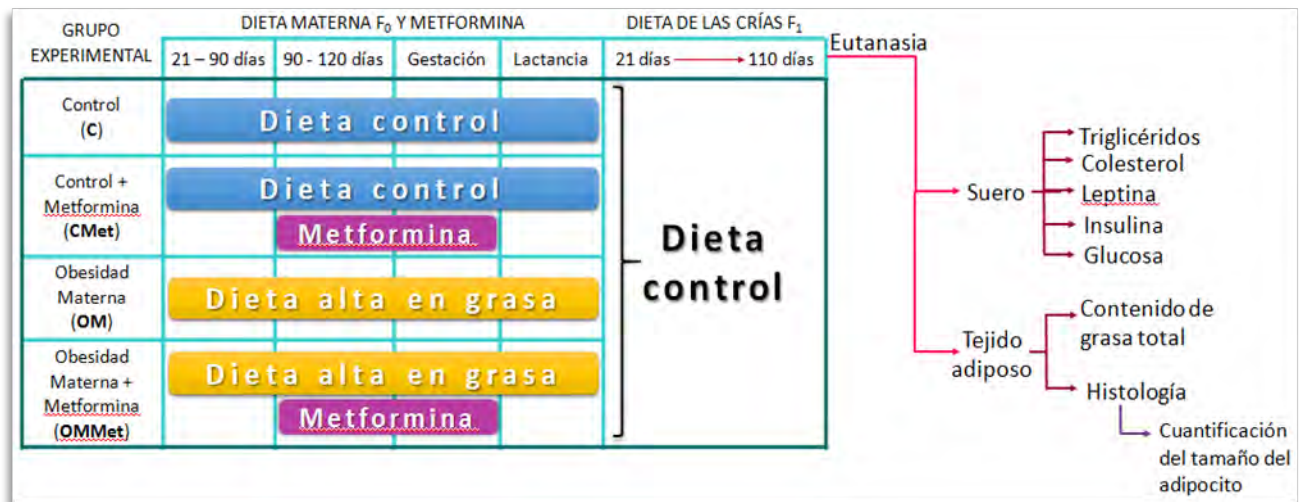
- **Grupo Control (C):** ratas alimentadas con dieta control desde el destete hasta el final de la lactancia de sus crías ( $n=8$ ).
- **Grupo de Obesidad Materna (OM):** ratas alimentadas con dieta alta en grasa desde el destete hasta el final de la lactancia de sus crías ( $n=8$ ).
- **Grupo Control intervenido con metformina previo y durante la gestación (CMet):** ratas alimentadas con dieta control desde el destete hasta el final de la lactancia de sus crías, pero que desde un mes previo y durante la gestación fueron tratadas con 300 mg/kg/día de metformina ( $n=8$ ).
- **Grupo de Obesidad Materna intervenido con metformina previo y durante la gestación (OMMet):** ratas alimentadas con dieta alta en grasa desde el destete hasta el final de la lactancia de sus crías, pero que desde un mes previo y durante la gestación fueron tratados con 300 mg/kg/día de metformina ( $n=8$ ).

Se obtuvieron las crías  $F_1$  de las  $F_0$  experimentales descritas anteriormente. Las crías fueron amamantadas por su respectiva madre y a los 21 días de edad se destetaron para

ser alimentadas con dieta control hasta el día de la eutanasia correspondiente, identificándolas con la misma nomenclatura del grupo experimental asignado a la madre.

El peso corporal de las F<sub>1</sub> fue registrado desde el nacimiento hasta el final del experimento, así como también fue registrada su ingesta de alimento durante 10 días partiendo del día 100. Se llevó a cabo la eutanasia de las F<sub>1</sub> a los 110 d, edad en la que se pesó el TA extraído durante la necropsia, almacenando muestras para su análisis bioquímico e histológico.

El diseño descrito anteriormente se esquematiza en la Figura 2:



**Figura 2.** Esquema general del diseño experimental.

El estudio de investigación se realizó en las crías hembra y macho, pero únicamente se presentan los datos experimentales correspondientes a las crías macho en la presente tesis.

# 7. MÉTODOS

## 7.1. Animales experimentales

Los animales empleados para este estudio fueron ratas albinas de la especie *Rattus norvegicus* de la cepa *Wistar* provenientes de la colonia mantenida en el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio (DIEB) del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Investigación en Animales (CINVA) del mismo instituto.

Tanto el alimento como el agua de bebida se administraron *ad libitum*. A lo largo del estudio, las ratas permanecieron en el área concedida dentro de dichas instalaciones, en donde se mantuvieron en condiciones de humedad relativa y temperatura controlada: 75% y 22±2°C, respectivamente. A su vez, se implementaron ciclos de luz/obscuridad de 12 horas (luces encendidas: 06:00 a 18:00 horas).

Los animales experimentales se alojaron en cajas estándar de acrílico, conocidas comúnmente como de tamaño *jumbo*; con una cama de aserrín de madera virgen (Aspen Chip Laboratory Bedding de Northeastern Products Corp., Nueva York, E.U.A.) cambiada periódicamente. Se colocaron de 3 a 5 animales por cada caja hasta antes del apareamiento, periodo a partir del cual sólo se colocó a una hembra F<sub>0</sub> por caja hasta el final del estudio.

## 7.2. Dietas administradas

La dieta Control consistió en alimento comercial para roedor Rodent RQ 22-5 de Zeigler®, formulada para mantenimiento, crecimiento, reproducción y lactancia de ratas y ratones convencionales conteniendo 5%<sub>(p/p)</sub> de grasa y un contenido energético de 4 kcal/g (Tabla 2). Mientras que la dieta Alta en Grasa se elaboró en la planta piloto del Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (DCyTA) del INCMNSZ, cuyo contenido de grasa fue del 20%<sub>(p/p)</sub> y el contenido energético de 5 kcal/g (Tabla 2), con una formulación diseñada con base a la recomendación AIN-93 del American Institute of



Nutrition (Reeves et al 1993) así como modificaciones hechas a ésta, por la Dra. Elena Zambrano y colaboradores (Tabla 3) (Zambrano et al 2010). Para su elaboración se utilizó una mezcladora de paletas Hobart modelo A-200 de 20 L de capacidad, potencia de 1/3 HP y 1425 rpm; el procedimiento de elaboración se describe con mayor detalle en el **Anexo I**.

**Tabla 2. Composición nutrimental de las dietas administradas.**

Nutriente	(% <sub>(p/p)</sub> )	
	Dieta Control <sup>†</sup>	Dieta Alta en Grasa <sup>‡</sup>
Proteína	22.0	23.4
<b>Grasa</b>	<b>5.0</b>	<b>25.0</b>
Polisacáridos	31.0	20.59
Azúcares simples	31.0	20.59
Fibra dietética	4.0	5.0
Minerales	6.0	5.0
Vitaminas	1.0	1.0
<b>Contenido Energético</b>	<b>4 kcal /g</b>	<b>5 kcal/g</b>

<sup>†</sup>Datos obtenidos del análisis garantizado de la dieta Rodent RQ 22-5 por el fabricante.

<sup>‡</sup>Datos calculados a partir de la formulación (ver Tabla 3).

**Tabla 3. Formulación de la dieta alta en grasa.**

Componente <sup>†</sup>	Concentración (g/100 g de Dieta)
Caseína	11.55
Caseinato de Calcio	11.55
L-Cistina, Diclorhidrato	0.3
Mezcla de Minerales AIN-76	5.0
Mezcla de Vitaminas AIN-93 VX	1.0
Colina, Clorhidrato	0.17
α-Celulosa	5.0
Almidón de maíz	20.59
Glucosa Anhidra	20.59
Aceite de Soya	5.0
<b>Manteca de cerdo</b>	<b>20.0</b>

<sup>†</sup> Las características de cada reactivo usado como componente de la dieta se abordan con mayor detalle en el Anexo I. Procedimiento para la elaboración de dietas experimentales.

### 7.3. Medición de peso corporal y determinación de ingesta

Una vez alcanzado los 21 días de edad en las F<sub>0</sub>, se midió y se registró de forma semanal, el peso corporal de cada una. Simultáneamente la ingesta se midió y se registró a partir del día 90 al 105, mientras que en los periodos de gestación y lactancia se midió de forma diaria. En cuanto a las F<sub>1</sub> macho, la ingesta se midió de los 70 a 75 días de edad, dicha determinación se realizó colocando de 3 ó 4 animales correspondientes al propio grupo en una misma caja; se pesó la cantidad de alimento presente en el comedero cada día a las 10:00 horas, reponiéndolo de tal manera que la cantidad de aquel no fuera inferior a 50 gramos. Los cálculos se realizaron de acuerdo a la Ecuación 2, las mediciones se realizaron en una balanza analítica ADAM® modelo PGW 1502e, (capacidad= 1500 g, d= 0.01 g), usándola en la función de pesaje de animales para el caso del peso corporal.

$$\text{Ingesta de alimento promedio} = \frac{A_i(g) - A_f(g)}{n} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

**A<sub>i</sub>**= Alimento inicial (g de alimento en el comedero al día anterior a la determinación)

**A<sub>f</sub>**= Alimento final (g alimento en el comedero el día de la determinación)

**n**= Número de animales en la caja durante la determinación

Para cada rata se calculó la ingesta de alimento relativa al peso corporal (Ecuación 3), en donde la ingesta de alimento promedio por día correspondiente a cada rata (Ecuación 2) se ajustó a cada 100 g del peso corporal, reportándose como (g/d/100 g de peso corporal).

$$\text{Ingesta de alimento relativa} = \frac{\text{Ingesta de alimento promedio}}{\text{Peso corporal (g)}} \times 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

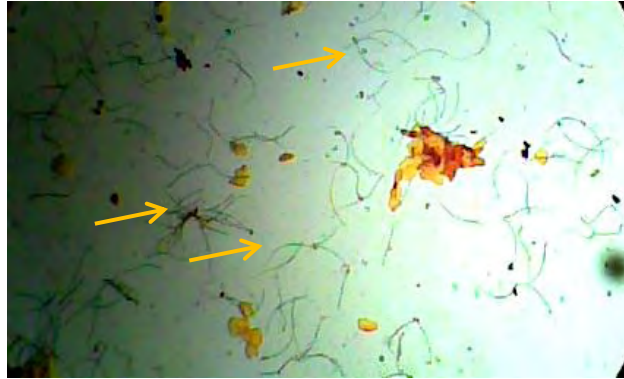
#### **7.4. Intervención con metformina de las hembras F<sub>0</sub>**

A los 90 días de edad, se inició la intervención con Met vía oral con una dosis de 300 mg de Met/día/kg de peso corporal de rata, la mitad de las hembras experimentales correspondientes al grupo C ( $n= 25$ ) y del grupo OM ( $n= 21$ ) fueron tratadas con el fármaco, respectivamente, el cual se preparó a la dosis indicada considerando el peso de las ratas, empleándose como excipiente carboximetilcelulosa al 0.5% (ver **Anexo II**). La administración con Met se mantuvo durante el periodo de gestación y se suspendió al inicio de la lactancia.

#### **7.5. Apareamiento y determinación de la preñez de las hembras F<sub>0</sub>**

Una vez que las hembras F<sub>0</sub> alcanzaron los 120 d, se colocaron de 2 a 3 roedores en una respectiva caja, en la cual a su vez, se instaló un macho no experimental de edad adulta, cuya fertilidad fue probada, a fin de que se llevara a cabo el apareamiento.

Para comprobar que se efectuó el apareamiento posterior a la colocación del macho, se realizó un *frotis* vaginal cada 24 horas (a las 08:00 horas) de forma diaria hasta observar la presencia de espermatozoides. La observación anterior se consideró como resultado positivo para el apareamiento, tomando el día del hallazgo como el día cero de gestación; momento en el cual el macho fue retirado de la caja de la hembra. Las ratas negativas para esta prueba por más de cinco días consecutivos fueron descartadas del experimento. Los *frotis* vaginales se tiñeron con solución de Lugol (obtenida de la Farmacia del Área de Hospitalización del INCMNSZ) y observados a 100X (Figura 3) con un microscopio fotónico (*Axiostar Plus de Carl Zeiss®*).



**Figura 3. Ejemplo de la observación de un frotis vaginal positivo para el apareamiento.** Tinción con solución de Lugol, Realizado después de dejar a la hembra con el macho por 24 horas en una misma caja. Es posible observar espermatozoides (como filamentos delgados opacos en el campo iluminado). Imagen vista a 100X y tomada con una cámara VGA a través del lente ocular.

### **7.6. Obtención del suero de las ratas experimentales F<sub>0</sub> y F<sub>1</sub>**

Al final de la lactancia, se seleccionó, de forma aleatoria, una muestra representativa de ratas F<sub>0</sub> (a los ~165 d) de cada grupo experimental, a las cuales se mantuvo en ayuno de 6 horas, dejándoles solamente agua *ad libitum*. Posteriormente, se llevó a cabo el sacrificio por decapitación rápida, con una guillotina para roedor (Thomas Scientific, Nueva Jersey, EE.UU.) momento en el cual se recolectó una muestra sanguínea (aproximadamente 5 mL) de la región cervical en un tubo de ensayo de borosilicato, el cual inmediatamente se centrifugó a 3100 rpm por 10 minutos a 4°C en un centrifuga refrigerada (Sorval®, RT7), con el fin de extraer el suero (sobrenadante), el cual se almacenó en tubos de polipropileno para microcentrífuga (Eppendorf®) de 1.5 mL y se congeló inmediatamente a -20°C, permaneciendo así por algunos días hasta la determinación de la química sanguínea y la concentración de leptina e insulina. El mismo procedimiento se realizó en las F<sub>1</sub> macho seleccionadas a los 110 d.

## 7.7. Extracción de tejido adiposo

Al terminar la recolección de sangre antes mencionada se procedió a la disección del cuerpo (Tabla 4), se extrajo el TA de diferente localización anatómica. Todos los tejidos se pesaron individualmente en una balanza analítica BP 310S de Sartorius® (Capacidad máxima= 320 g, d= 0.001 g).

**Tabla 4. Localización del tejido adiposo extraído en las crías macho de 110 d.** Se indican cuáles se extrajeron sólo en machos

Localización del tejido adiposo
Retroperitoneal
Pancreático
Esternón
Epidídimo
Gonadal

Con los datos registrados de la cantidad de TA extraído tanto en las madres F<sub>0</sub> como en las crías macho F<sub>1</sub> después de la eutanasia por decapitación, se determinó el IA, el cual se reporta como % del peso corporal con lo cual se pretende tener una mejor estimación del desarrollo del fenotipo obeso en los animales experimentales, debido a que este parámetro está estrechamente relacionado con el contenido de TA en el cuerpo (Kumar et al 1999, Taylor & Phillips 1996). Este valor es calculado por medio de la Ecuación 4.

$$B. \text{Índice de Adiposidad}_{\text{Machos}} = \left( \frac{a + b + c + d + e}{f} \right) 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

*a* =Tejido Adiposo Retroperitoneal en g

*b* =Tejido Adiposo Pancreático en g

*c* =Tejido Adiposo del Esternón en g

*d* =Tejido Adiposo del Epidídimo en g

*e* =Tejido Adiposo del Gonadal en g

*f* = Peso corporal en g

## 7.8. Histología del tejido adiposo de las crías macho F<sub>1</sub> (110 d)

Una vez determinado el peso del TAR, se seccionó una porción de aproximadamente 300 mg y se fijó con 8 mL de solución al 10% (p/v) de paraformaldehído en amortiguador salino de fosfato (PBS) a 0.05 M 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 M 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, éste 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 se desparafinaron y se rehidrataron para su posterior tinción con HE mediante la técnica estándar (**Anexo III**) (Fischer et al 2008).

Los cortes histológicos teñidos se observaron 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. Cada micrografía digital correspondiente a un grupo 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 µm<sup>2</sup>, con ayuda del programa de computadora AxioVision Rel. 4.8.

## 7.9. Química sanguínea

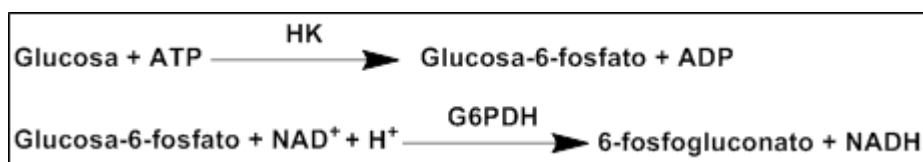
Las muestras séricas conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , se descongelaron a temperatura ambiente durante 15 minutos previos al inicio del análisis, momento en el cual se colocaron en las celdillas del equipo para ser procesadas.

La medición de la concentración sanguínea de glucosa, colesterol total, y triglicéridos, se realizó con el sistema automatizado SYNCHRON CX® 5 Delta de Beckman-Coulter el cual utiliza el multicalibrador MULTI™ SYNCHRON CX diseñado para este sistema (que incluye los parámetros que nos interesan, entre otros), también se procesaron las muestras de control de calidad correspondientes. Las determinaciones se llevaron a cabo con reactivos diseñados especialmente para este sistema y los parámetros antes mencionados se programaron en el equipo, el cual básicamente realiza un análisis espectrofotométrico a partir de ensayos enzimáticos que se describen a continuación:

### 7.9.1. Glucosa

La concentración se determinó por un método de punto final a tiempo fijo utilizando un reactivo denominado GLU (Ref.: 442640), compuesto por: ATP 3.8 mM,  $\text{NAD}^+$  2.7 mM, hexocinasa (HK) 2,0 KU/L glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) 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 que se verifican en el sistema de análisis (Figura 4) la HK 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  $\text{NAD}^+$  a NADH por la acción catalítica de la G6PDH.



**Figura 4.** Reacciones químicas que suceden en la cuantificación de glucosa en suero.

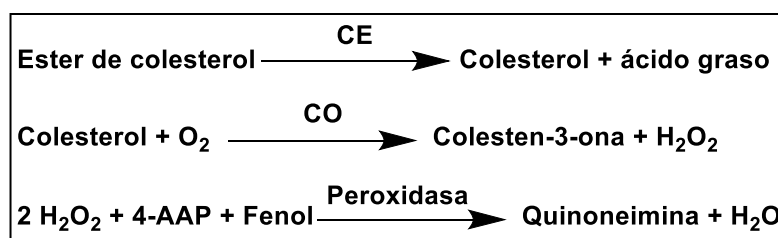
**ATP:** adenosin trifosfato; **HK:** hexocinasa; **ADP:** adenosin difosfato;  **$\text{NAD}^+$ :** dinucleótido de nicotinamida adenina oxidado; **G6PDH:** glucosa-6-fosfato deshidrogenasa;  **$\text{H}^+$ :** protón; **NADH:** dinucleótido de nicotinamida adenina reducido.

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.

### 7.9.2. Colesterol

Se utiliza un método de punto final a tiempo fijo empleando el reactivo CHOL (No. Ref.: 467825) el cual se compone de 4-aminoatirpirina (4-AAP) 0.28 mM, fenol 8,06 mM, colesterol esterasa (CE) 211 UI/L, colesterol oxidasa (CO) 216 UI/L, peroxidasa 6667 UI/L, además de otras sustancias no reactivas necesarias para el funcionamiento óptimo del sistema. El SYNCHRON CX® dispensa en forma automática los volúmenes apropiados de muestra y reactivo en una celdilla, en proporción de 1 parte de muestra a 100 partes de reactivo.

En las reacciones efectuadas (Figura 5) en el equipo, la CE 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 CO, la peroxidasa cataliza la reacción del peróxido de hidrógeno con 4-AAP y fenol produciendo quinoneína, un producto colorido.



**Figura 5.** Reacciones químicas empleadas en la cuantificación de colesterol en suero.

**CE:** colesterol esterasa; **O<sub>2</sub>:** oxígeno; **CO:** colesterol oxidasa; **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrógeno; **4-AAP:** 4-aminoatirpirina, **H<sub>2</sub>O:** agua.

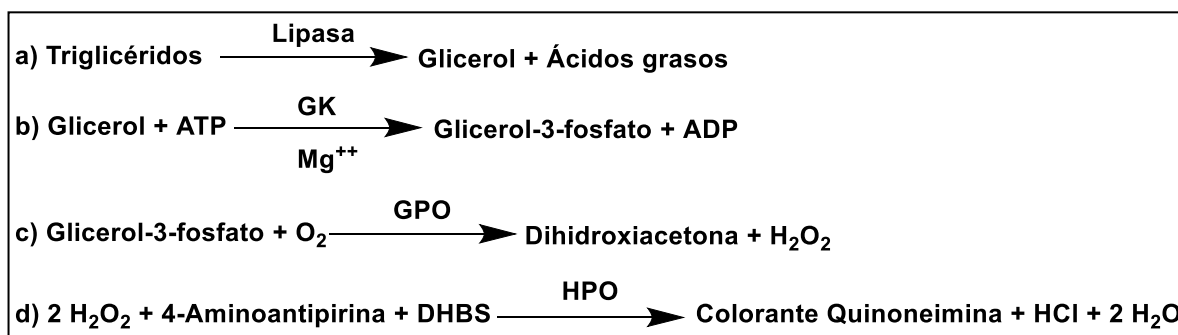
Así, el sistema determina el cambio de absorbancia a  $\lambda=582$  nm, ya que éste es proporcional a la cantidad de colesterol en la muestra, de este modo el sistema puede calcular y expresar la concentración de colesterol en mg/dL.



### 7.9.3. Triglicéridos

Para esta determinación se utiliza el reactivo triglicéridos GPO (ref.: 445850). Mediante un método de punto final a tiempo fijo el sistema dispensa automáticamente los volúmenes en proporción de 1 parte de muestra por cada 100 partes de reactivo. El reactivo se compone de: lipasa 68 U/L, ATP 2,56 mM, glicerol cinasa (GK) 4 KUI/L, glicerofosfato oxidasa (GPO) 1,1 KUI/L, 4-AAP 0,71 mM, ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenzeno sulfónico (DHBS) 1,56 mM, peróxidasa de rábano (HPO) 9 KUI/L, además de otras sustancias no reactivas necesarias para el funcionamiento óptimo del sistema.

Los TG de la muestra, por la adición del reactivo (Figura 6), son hidrolizados a glicerol y ácidos grasos libres por medio de la lipasa (Figura 6) **(a)**. Se da así una secuencia de tres pasos enzimáticos justamente, por la GK (Figura 6) **(b)** el glicerol se transforma en glicerol-3-fosfato, y éste por acción de la GPO (Figura 6) **(c)** se transforma en dihidroxiacetona y  $H_2O_2$  y así la HPO (Figura 6) **(d)** causa el acoplamiento oxidante a partir del peróxido de hidrógeno generado junto con el DHBS y la 4-AAP forman un colorante rojo de quinoneímina.

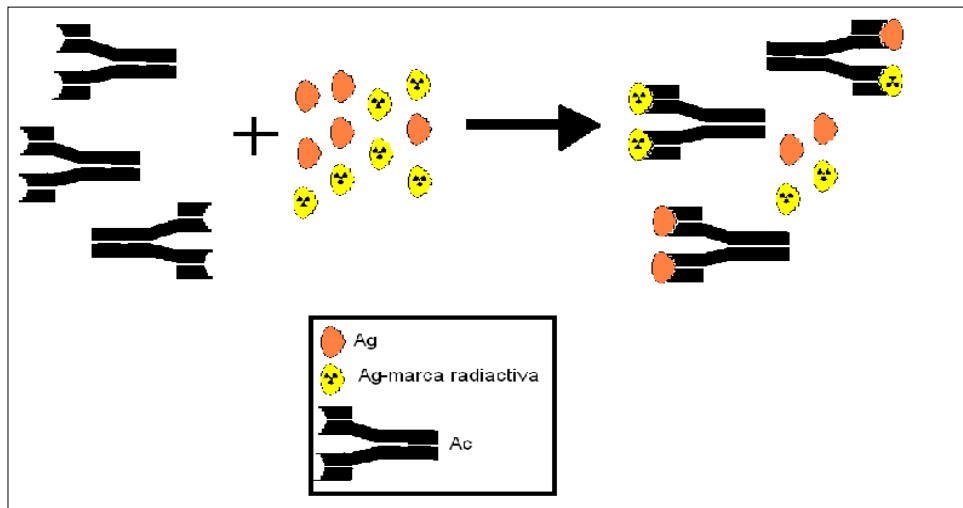


**Figura 6.** Reacciones químicas empleadas en la cuantificación de triglicéridos en suero. **ATP:** adenosin trifosfato; **GK:** glicerol cinasa; **Mg<sup>++</sup>:** magnesio; **ADP:** adenosin difosfato; **O<sub>2</sub>:** oxígeno; **GPO:** glicerofosfato oxidasa; **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrógeno; **DHBS:** ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenzeno sulfónico; **HPO:** peroxidasa de rábano; **HCl:** ácido clorhídrico; **H<sub>2</sub>O:** agua.

El sistema monitoriza la variación de la absorbancia a  $\lambda=520$  nm justo antes de la adición de lipasa y durante un intervalo fijo de tiempo tras la adición. Esta variación de la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de TG en la muestra y el sistema la utiliza para calcular y expresar la concentración de TG en mg/dL.

## 7.10. Determinación de hormonas

Se determinó la concentración de insulina y leptina por Radio-Inmuno Análisis (RIA, por sus siglas en inglés), la cual es una técnica altamente sensible y específica. En dicha técnica, una concentración establecida de antígeno marcado radiactivamente mezclada con una concentración desconocida de antígeno considerado como el analito (de la muestra), es incubada con una dilución constante de antisuero de tal forma que la concentración de sitios de unión del antígeno en los anticuerpos es limitada, (por ejemplo, cuando sólo el 50% del antígeno puede ser unido al anticuerpo). En este sistema habrá una 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 (Figura 7). Así, la cantidad de antígeno marcado unido al anticuerpo disminuirá a medida que la concentración de antígeno no marcado aumente. Esto puede ser medido después de separar el complejo antígeno-anticuerpo formado del antígeno marcado libre (por inmunoprecipitación por ejemplo), 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 esta curva, la cantidad desconocida de antígeno en la muestras puede ser calculada (Lehninger et al 2008).



**Figura 7. Esquema del principio del RIA.** Se representa la reacción antígeno-anticuerpo del anticuerpo (Ac) específico para el antígeno marcado (Ag-marca radiactiva) y no marcado (Ag) los cuales “compiten” por los sitios de unión debido a la cantidad limitada de anticuerpo en el sistema.

Las muestras en suero conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , se descongelaron a temperatura ambiente durante 15 minutos antes de colocar una cantidad de 100  $\mu\text{L}$  de muestra en tubos de boro-silicato para centelleo según el protocolo de la determinación con el estuche correspondiente.

#### **7.10.1. Leptina**

Se utilizó un estuche de RIA para leptina de rata de LINCO® Research No. de catálogo: RL-83K, el cual utiliza leptina de rata marcada con el isótopo radiactivo  $^{125}\text{I}$  y un antisuero específico para leptina de rata con una sensibilidad de 0.5 ng/mL, así como un contador de radiaciones  $\gamma$  (Packard Instruments Co., California, EE.UU.). Cabe señalar que el estuche contiene sus propios patrones de leptina con los cuales se elaboró la curva patrón (el procedimiento y la curva patrón se describen con mayor detalle en el **Anexo IV.A.**).

#### **7.10.2. Insulina.**

Se utilizó un estuche de RIA para insulina de rata de LINCO® Research No. de catálogo: RI-13K, en el cual se emplea insulina de rata marcada con el isótopo radiactivo  $^{125}\text{I}$  y un antisuero específico para insulina de rata con una sensibilidad de 0.1 ng/mL, el estuche contiene sus propios estándares de insulina con los cuales se elaboró la curva patrón; asimismo se usó un contador de radiaciones  $\gamma$  (Packard Instruments Co, California, EE.UU.) (el procedimiento y la curva patrón se describen con mayor detalle en el **Anexo IV.B.**).

#### **7.10.3. Índice de resistencia a la insulina**

El índice de resistencia a la insulina (IRI) se determinó de acuerdo a la Ecuación 5, 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 et al 1985).

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

**Ecuación 5**

## **7.11. Métodos estadísticos**

### **7.11.1. Análisis estadístico de parámetros maternos F<sub>0</sub>**

Los diversos parámetros maternos F<sub>0</sub> se analizaron estadísticamente mediante la prueba *t* de Student, empleando una  $n= 7$  a 8 ratas por grupo experimental, considerando un valor de  $p<0.05$  como significativo. Los datos se expresan como la media aritmética  $\pm$  EE.

### **7.11.2. Análisis de parámetros de las crías macho F<sub>1</sub>**

Los diferentes parámetros obtenidos de las crías a distintas etapas de la vida, se analizaron por medio del análisis de varianza de una vía (ANOVA, por sus siglas en inglés) y las diferencias entre medias se determinaron con la prueba de Tukey *post hoc*, empleando una  $n= 8$  ratas por grupo experimental, considerando un valor de  $p<0.05$  como significativo. Los datos se expresan como la media aritmética  $\pm$  EE.

### **7.11.3. Análisis del tamaño del adipocito en crías macho F<sub>1</sub> de 110 d**

Para la presentación del análisis del tamaño del adipocito se realizaron histogramas de frecuencia relativa por cada grupo experimental. Se utilizaron 8 ratas por cada grupo para la cuantificación del área del adipocito de una muestra de 250 ( $n=250$ ). Los datos se agruparon desde el origen en categorías correspondientes a intervalos de 500  $\mu\text{m}^2$  en machos.

El ancho de categoría ( $w$ ; Ecuación 6) se define como la aproximación del cociente entre el área del adipocito del grupo C (*Valor máximo - Valor mínimo*) y el número de clases ( $n$ ) el cual es representado por la regla de Sturges ( $1+\log_2 n$ ) (Sturges 1926).

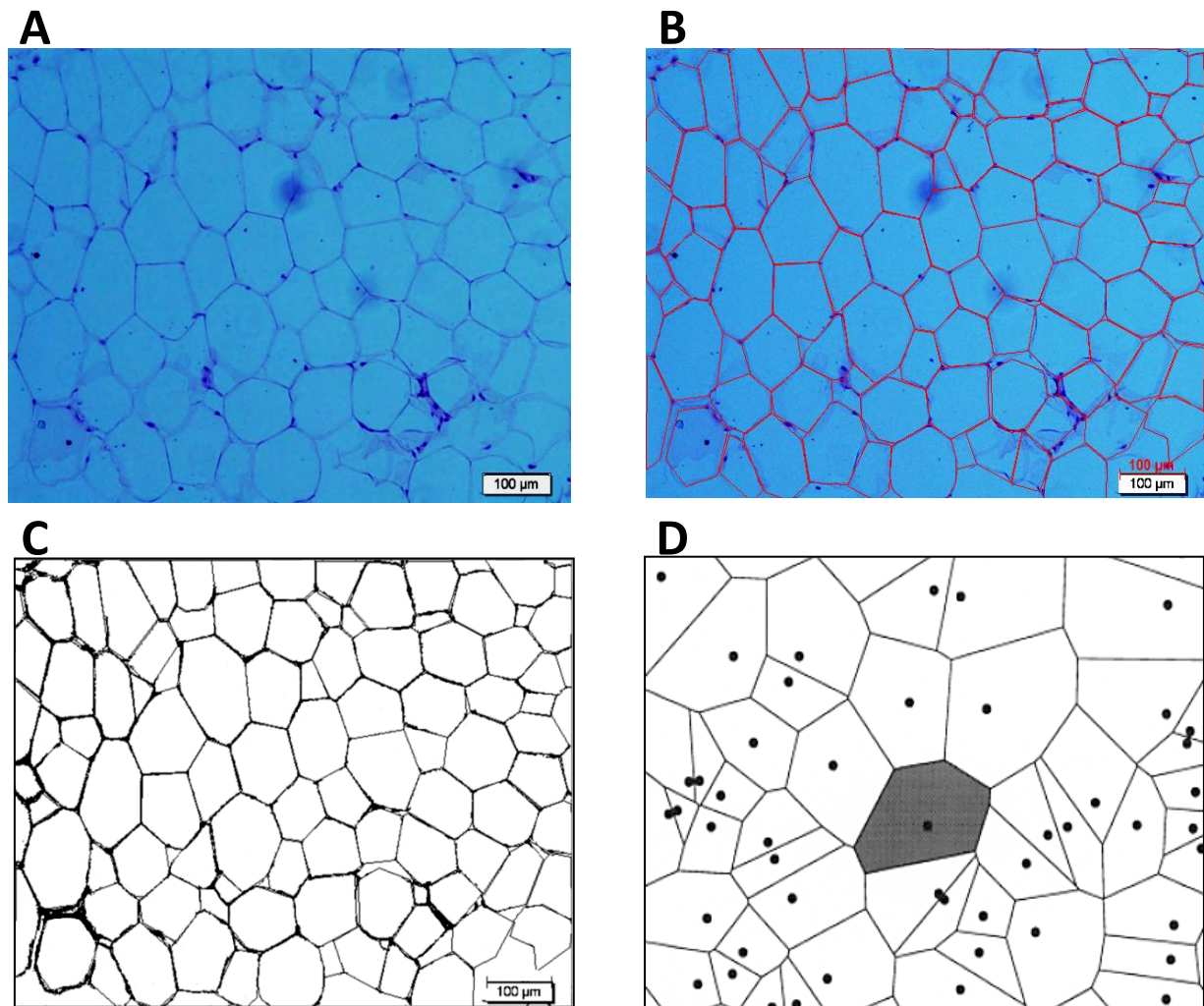
$$w \approx \frac{\text{Valor Máximo} - \text{Valor Mínimo}}{1 + \log_2 n}$$

**Ecuaci3n 6**

En el caso del tamaño del adipocito, los datos no siguen una distribuci3n normal por lo que se realiz3 la prueba de Kruskal-Wallis. Los adipocitos adoptan una configuraci3n poli3drica cuando están agrupados en el tejido adiposo pero al analizarlos en dos dimensiones tienen un aspecto reticular característico en el que se observan celdas delimitadas por polígonos en cada c3lula (Figura 8. **A.**).

El aspecto reticular de los adipocitos sugiere la aplicaci3n del Diagrama de Poisson-Voronoi (DPV). El DPV es un caso particular de la divisi3n del espacio en dos dimensiones, donde 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 como se muestra en la Figura 8. **D.** (Tanemura 2004).

Los DPV son especialmente importantes para modelar y describir una amplia variedad de fen3menos naturales y sociales. Se ha propuesto que la distribuci3n de tamaño de las celdas de Poisson-Voronoi se ajusta a la funci3n de densidad de probabilidad gamma (Ferenc & N3da 2007). De esta manera se puede modelar la frecuencia relativa del área del adipocito como funci3n del área del adipocito mediante la distribuci3n Gamma.



**Figura 8. Tamaño del adipocito de las crías macho F<sub>1</sub> a los 110 d.** **A.** Micrografía de TAR a 20X teñida con HE, **B.** Cuantificación a través de la delimitación de áreas de los adipocitos con un software AxioVision40 V 4.8.2.0., **C.** Áreas delimitadas en la micrografía, **D.** Diagrama de Poisson-Voronoi con el área de una celda sombreada.

La función de densidad de probabilidad gamma (FDP gamma; Ecuación 7) 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).

La función gamma se ha empleado ampliamente en la distribución de partículas, tales como análisis de aerosoles y microscopía electrónica, así como en equipos de difusión de luz dinámica (Babick & Ullmann 2016).

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

**Ecuación 7**

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 ... = Base de logaritmos naturales

Los parámetros de forma ( $a$ ) y de escala inverso ( $b$ ) (Ecuaciones 8 y 9, respectivamente) (Panik 2005, Wackerly et al 2007), permiten utilizar el total de los datos del área de los adipocitos obtenidos en cada grupo.

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

**Ecuación 8**

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

**Ecuación 9**

Donde:

$n$ = Número de adipocitos medidos

$\bar{x}$ = Área promedio del adipocito

$x_i$ =Área del  $i$ -ésimo adipocito

La función gamma (Ecuación 10) aparece en el denominador de la FDP gamma (Ecuación 7) y es una integral definida.

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

**Ecuación 10**

Donde:

$t$ = Variable real

$e$ = 2.71828 ... = Base de logaritmos naturales

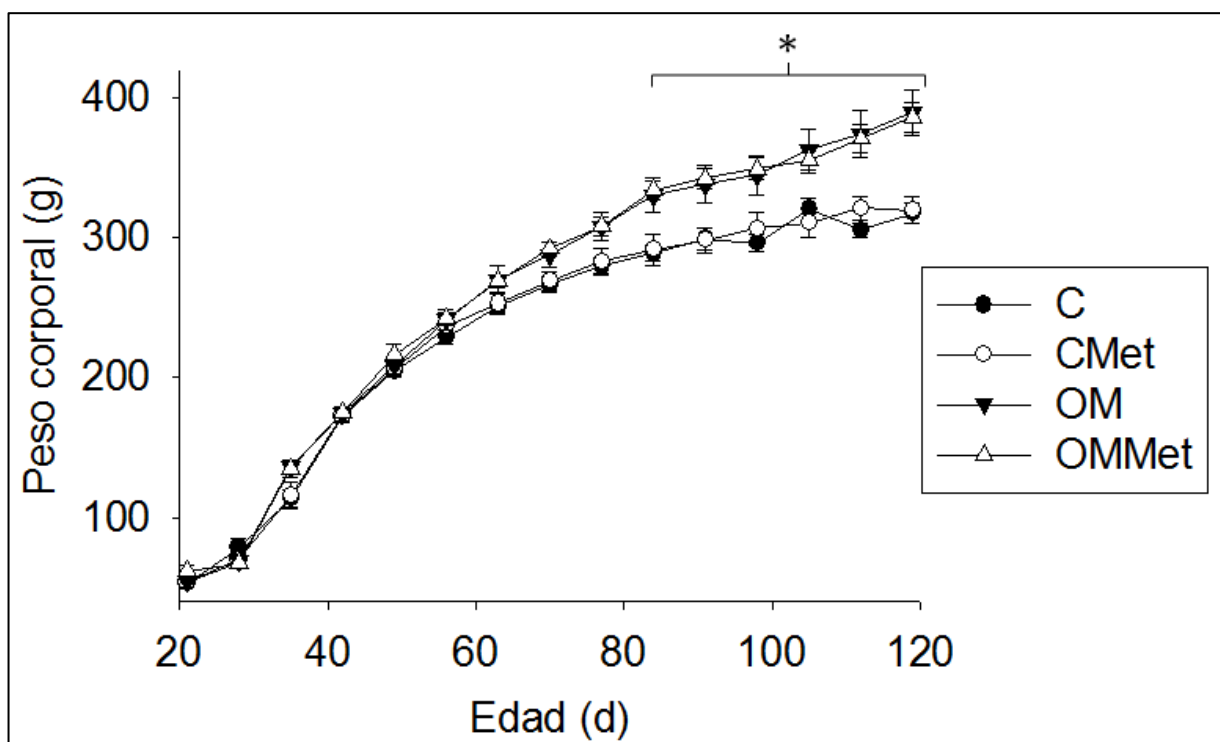
# 8. RESULTADOS

## Madres experimentales F<sub>0</sub>

### 8.1. Crecimiento materno F<sub>0</sub>

#### 8.1.1. *Peso corporal (antes del apareamiento)*

El peso corporal de las madres experimentales F<sub>0</sub> se registró semanalmente antes del apareamiento. Aunque, alrededor del día 60, la ganancia de peso corporal fue mayor en los grupos alimentados con dieta alta en grasa, OM y OMMet, respecto a los grupos alimentados con dieta control, C y CMet, estadísticamente, es a partir del día 84, donde la diferencia de peso corporal fue significativa ( $*p > 0.05$ ) entre el grupo control y el grupo obeso materno, sin observarse cambios significativos en el peso corporal de los grupos intervenidos con metformina (Met) del grupo C y grupo OM (Figura 9).



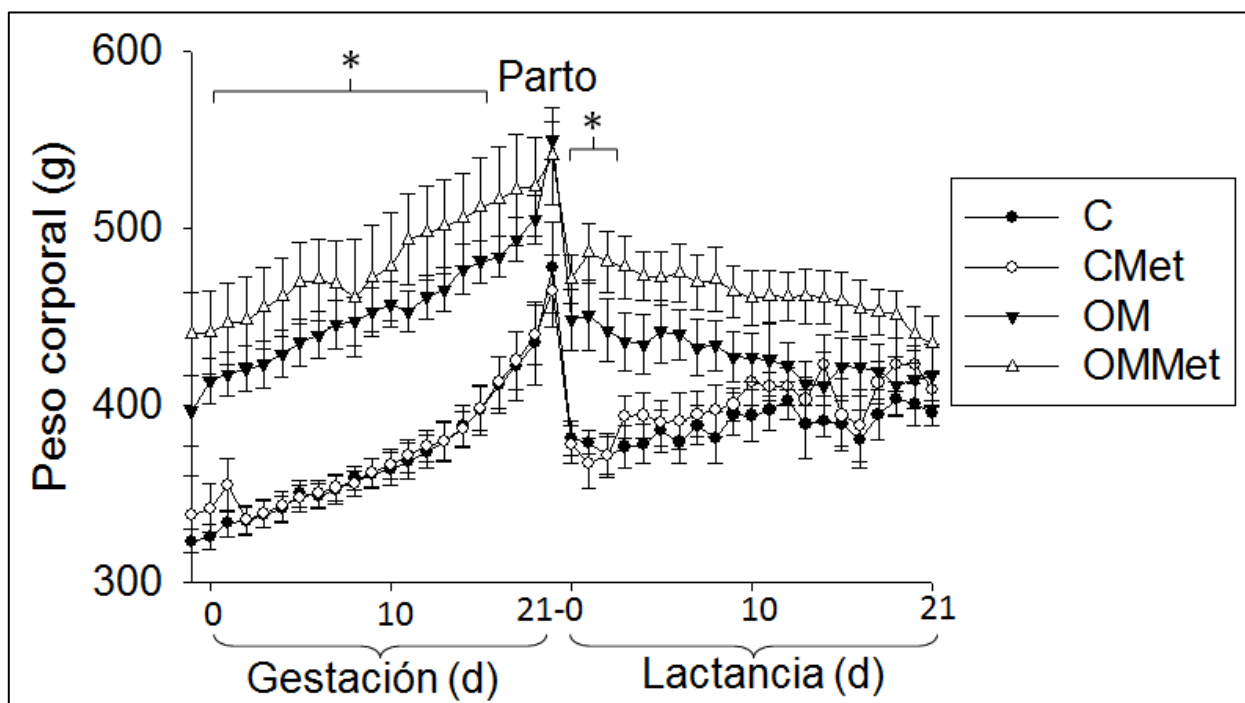
**Figura 9. Ganancia de peso corporal materno (F<sub>0</sub>) antes del apareamiento.** Se muestran los datos de los grupos: C (círculos en negro), CMet (círculos en blanco), OM (triángulos en negro) y OMMet (triángulos en blanco). Media  $\pm$  EE,  $n = 7$  a 8 ratas por grupo experimental. (\*) Denota diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) desde los 84 días de edad entre grupos con diferente tipo de alimentación (C y CMet vs. OM y OMMet).



## 8.2. Parámetros obtenidos durante la gestación y lactancia

### 8.2.1. Peso corporal

En la Figura 10 se observa que, durante el periodo de gestación, el peso corporal materno de los grupos OM y OMMet fueron mayores respecto al de los grupos C y CMet, sin observarse diferencias significativas entre estos últimos. Al inicio de la lactancia (día 21 de la gestación), se observó una disminución en el peso corporal de los cuatro grupos maternos, sin efecto alguno por parte de la metformina, sólo con base en el tipo de dieta ingerida, donde durante los primeros 3 d de lactancia los grupos OM y OMMet presentaron mayor peso corporal respecto al de los grupos C y CMet, posteriormente se observó una disminución gradual del peso corporal de los grupos OM y OMMet que tendieron a igualarse a los C y CMet.



**Figura 10. Ganancia de peso corporal materno durante las etapas de Gestación y Lactancia.** Se muestran los datos de los grupos C (círculos en negro), CMet (círculos en blanco), OM (triángulos en negro) y OMMet (triángulos en blanco). Media  $\pm$  EE,  $n = 7$  a 8 ratas por grupo experimental. (\*) Denota diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

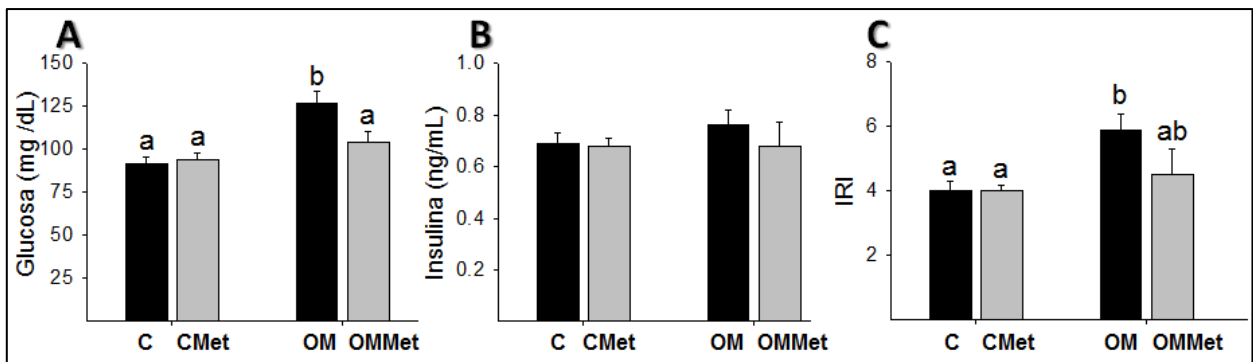
### 8.3. Parámetros obtenidos al día 21 de lactancia

#### 8.3.1. Metabolismo de hidratos de carbono

En las madres  $F_0$  experimentales, al finalizar el periodo de lactancia, se cuantificó la concentración de glucosa e insulina en suero. Se observó un aumento significativo en la concentración de glucosa entre el grupo OM respecto al grupo C, mientras que la concentración de insulina no presentó diferencia entre los grupos experimentales (Figura 11. **B**).

Sin embargo, en el grupo OMMet, se observó un efecto en la reducción de la glucosa de forma significativa respecto al grupo OM (Figura 11. **A**).

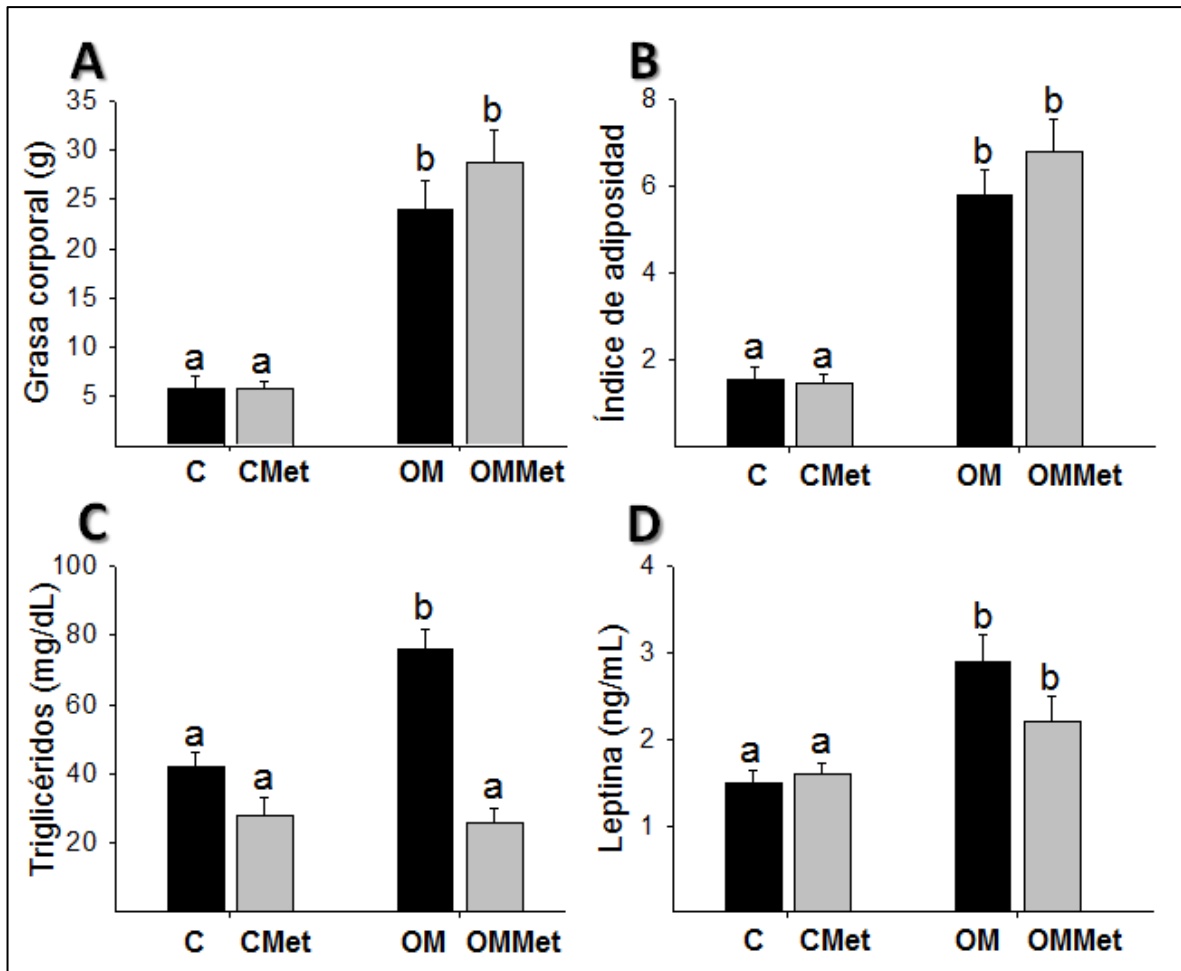
A su vez, se determinó el IRI a partir de dichos parámetros con base en la Ecuación 5, el cual fue mayor en madres OM respecto a las madres C, pero con una reducción parcial en el grupo OMMet como se observa en la Figura 11. **C**.



**Figura 11. Metabolismo de carbohidratos de las Madres  $F_0$  a los 21 días de Lactancia ~ (165d).** **A.** Glucosa, **B.** Insulina y **C.** Índice de Resistencia a la Insulina (IRI), los datos se muestran como la media  $\pm$  EE,  $n= 8$  ratas por grupo experimental. Grupos que no comparten al menos una misma letra son estadísticamente diferentes ( $p<0.05$ ).

### 8.3.2. Adiposidad materna

El tejido adiposo extraído en cada grupo materno se pesó y se determinó el IA (Ecuación 4), siendo significativamente mayor la cantidad de grasa corporal y el IA de los grupos OM y OMMet respecto a los grupos C y CMet (Figura 12. **A, B**).



**Figura 12. Adiposidad de las madres  $F_0$  a los 21 días de lactancia (~165 d).** Se reporta la cantidad de **A.** Grasa total e **B.** Índice de adiposidad (IA), así como la concentración de **C.** Triglicéridos (TG) y **D.** Leptina. Los datos se muestran como Media  $\pm$  EE,  $n= 8$  ratas por grupo experimental. Grupos que no comparten al menos una misma letra son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

A su vez, se cuantificó la concentración de TG y leptina en suero, en los que se observó una mayor concentración en el grupo OM respecto al grupo C, no obstante, el grupo OMMet presentó una disminución significativa en TG, pero no en leptina, lo cual indica que las madres OM y OMMet son más lipogénicas en comparación a las madres C y CMet (Figura 12. **C, D**).

## Crías F<sub>1</sub>

### 8.4. Parámetros obtenidos a partir de la lactancia (21 d) hasta 110 d

#### 8.4.1. Peso corporal de las crías macho F<sub>1</sub>

El peso corporal de las crías F<sub>1</sub> se midió a los 0 d (nacimiento), 21 d (día del destete) y 110 d (joven adulto) de edad.

En las crías macho, el peso corporal no presentó diferencia significativa tanto en los grupos experimentales como entre las edades (Tabla 5).

**Tabla 5. Peso corporal de las crías macho F<sub>1</sub> a los 0, 21 y 110 d.** Los datos se muestran como Media  $\pm$  EE,  $n= 8$  ratas por grupo experimental.

Edad	Grupo experimental	MACHO			
		C	CMet	OM	OMMet
<b>0 d (Nacimiento)</b>		7.0 $\pm$ 0.1	6.6 $\pm$ 0.1	6.6 $\pm$ 0.1	6.4 $\pm$ 0.1
<b>21 d</b>		65 $\pm$ 1	78 $\pm$ 2	79 $\pm$ 4	76 $\pm$ 3
<b>110 d</b>		451 $\pm$ 12	462 $\pm$ 12	471 $\pm$ 13	457 $\pm$ 21

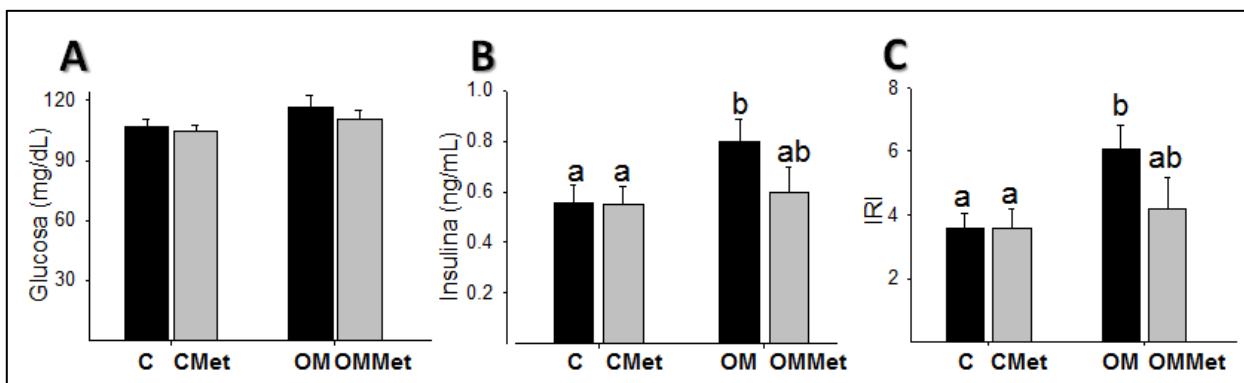
Sin embargo, se observa que, numéricamente, al nacimiento, las crías macho C fueron de mayor peso corporal respecto a las crías macho OM. Mientras que en las edades de 21 y 110 d, la tendencia cambió en que las crías macho OM tuvieron un mayor peso corporal comparado con las crías macho C.

## 8.5. Parámetros a los 110 d de edad

### 8.5.1. Metabolismo de hidratos de carbono

Se cuantificó la concentración de glucosa e insulina en suero, así como el cálculo del IRI en los descendientes macho F<sub>1</sub> a los 110 d.

En las crías macho se observó que la concentración de glucosa fue similar entre los grupos experimentales. La insulina en suero presentó una mayor concentración en el grupo OM respecto al grupo C, mientras que el grupo CMet no presentó diferencia significativa respecto al grupo C y el grupo OMMet no mostró diferencia significativa respecto al grupo OM ni al grupo C, observándose un valor intermedio entre dichos grupos. De forma similar, se comportó el IRI en las crías macho (Figura 13).



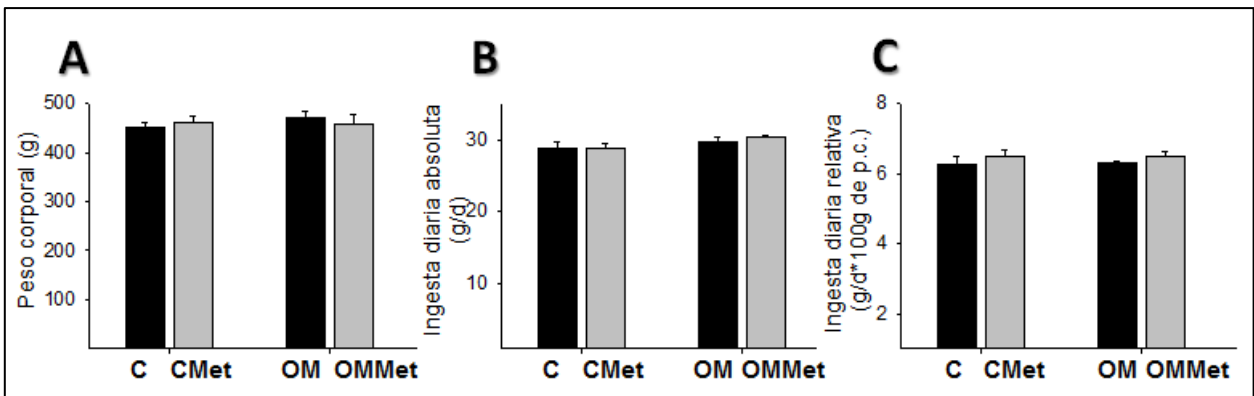
**Figura 13. Metabolismo de hidratos de carbono de las crías macho F<sub>1</sub> a los 110 d.** Se reporta la concentración de **A.** Glucosa e **B.** Insulina en suero, así como el **C.** Índice de resistencia a la insulina (IRI), respectivamente. Los datos se muestran como Media ± EE, n = 8 ratas por grupo experimental. Grupos que no comparten al menos una misma letra son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

### 8.5.2. *Peso corporal e ingesta*

A los 110 d se registró el peso corporal, la ingesta diaria absoluta y la ingesta diaria relativa al peso corporal en las crías macho F<sub>1</sub>.

En los datos de peso corporal se observó que no hubo diferencia estadística entre los cuatro grupos experimentales (Figura 14 **A**).

Por el otro lado, la ingesta diaria absoluta y la ingesta diaria relativa al peso corporal tampoco presentaron diferencias significativas entre los grupos experimentales (Figura 14 **B, C**).



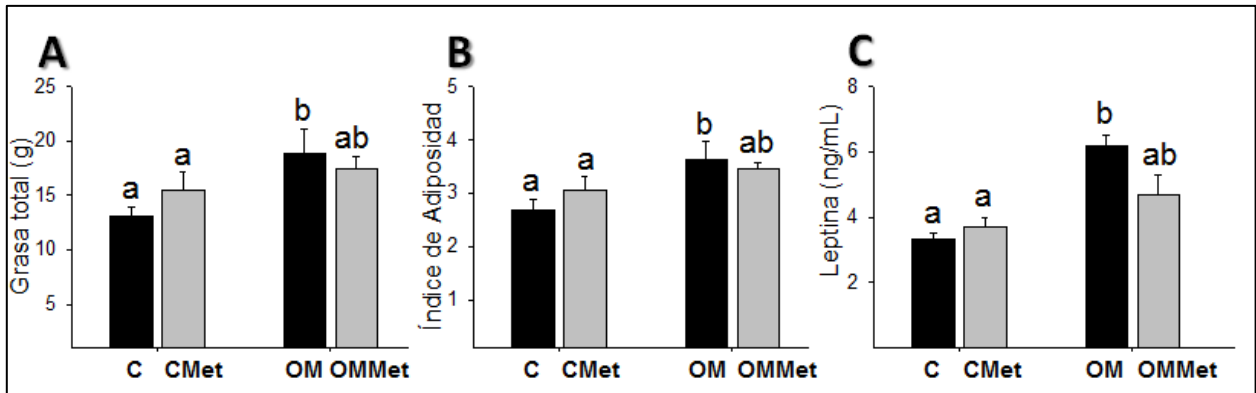
**Figura 14. Peso corporal e ingesta de las crías macho F<sub>1</sub> a los 110 d.** Se reporta el **A**. Peso corporal, la **B**. Ingesta diaria absoluta y la **C**. Ingesta diaria relativa al peso corporal, respectivamente. Los datos se muestran como Media  $\pm$  EE,  $n=8$  ratas por grupo experimental.

### 8.5.3. Adiposidad

En las crías macho F<sub>1</sub> de 110 d, se determinó la cantidad de grasa total así como el IA y la concentración de leptina en suero.

En las crías macho experimentales se observó un aumento significativo en la cantidad de grasa total e IA en el grupo OM respecto al grupo C, mientras que en el grupo CMet no se observó diferencia significativa con el grupo C. Sin embargo, el grupo OMMet no fue diferente del grupo C ni del grupo OM, observándose un valor intermedio significativo (Figura 15 A, B).

La concentración de leptina en suero fue significativamente mayor en el grupo OM respecto al grupo C, mientras que en el grupo CMet no varió significativamente respecto al grupo C. No obstante, en el grupo OMMet la concentración de leptina tuvo un valor intermedio sin ser significativamente diferente al grupo C ni al grupo OM (Figura 15 C).



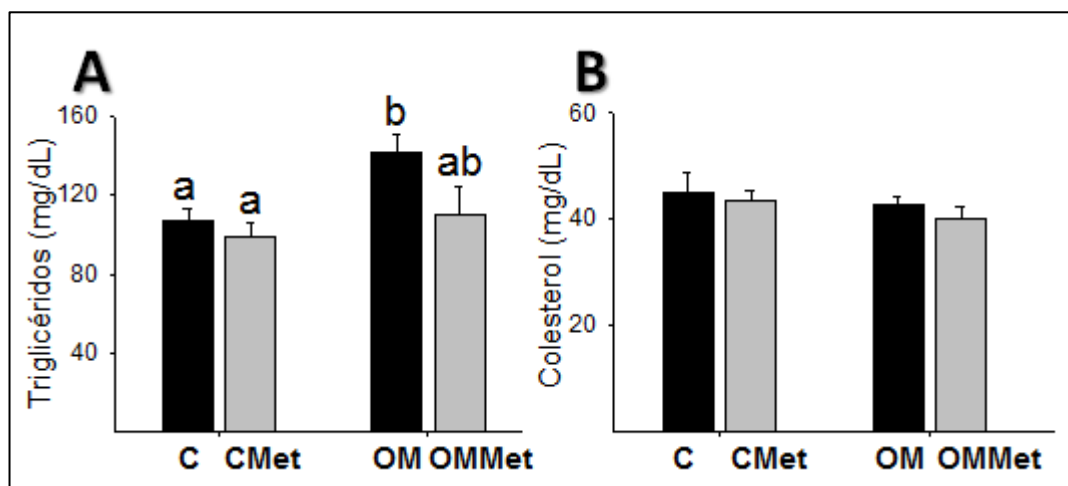
**Figura 15. Adiposidad de las crías macho F<sub>1</sub> a los 110 d.** Se reporta la **A.** Grasa total, **B.** Índice de adiposidad y la concentración de **C.** Leptina, respectivamente. Los datos se muestran como Media  $\pm$  EE,  $n= 8$  ratas por grupo experimental. Grupos que no comparten al menos una misma letra son estadísticamente diferentes ( $p<0.05$ ).

#### 8.5.4. Metabolismo de lípidos

Se cuantificó la concentración de TG y colesterol en suero de las crías macho F<sub>1</sub> a los 110 d.

En las crías macho se observó que la concentración de TG fue significativamente mayor en el grupo OM respecto al grupo C. Sin embargo, en el grupo OMMet, la concentración de TG no fue diferente del grupo OM, pero tampoco fue diferente del grupo C, observando un valor intermedio en ambos (Figura 16 **A**).

Mientras que la concentración de colesterol no fue diferente entre los grupos experimentales a esta edad (Figura 16 **B**).



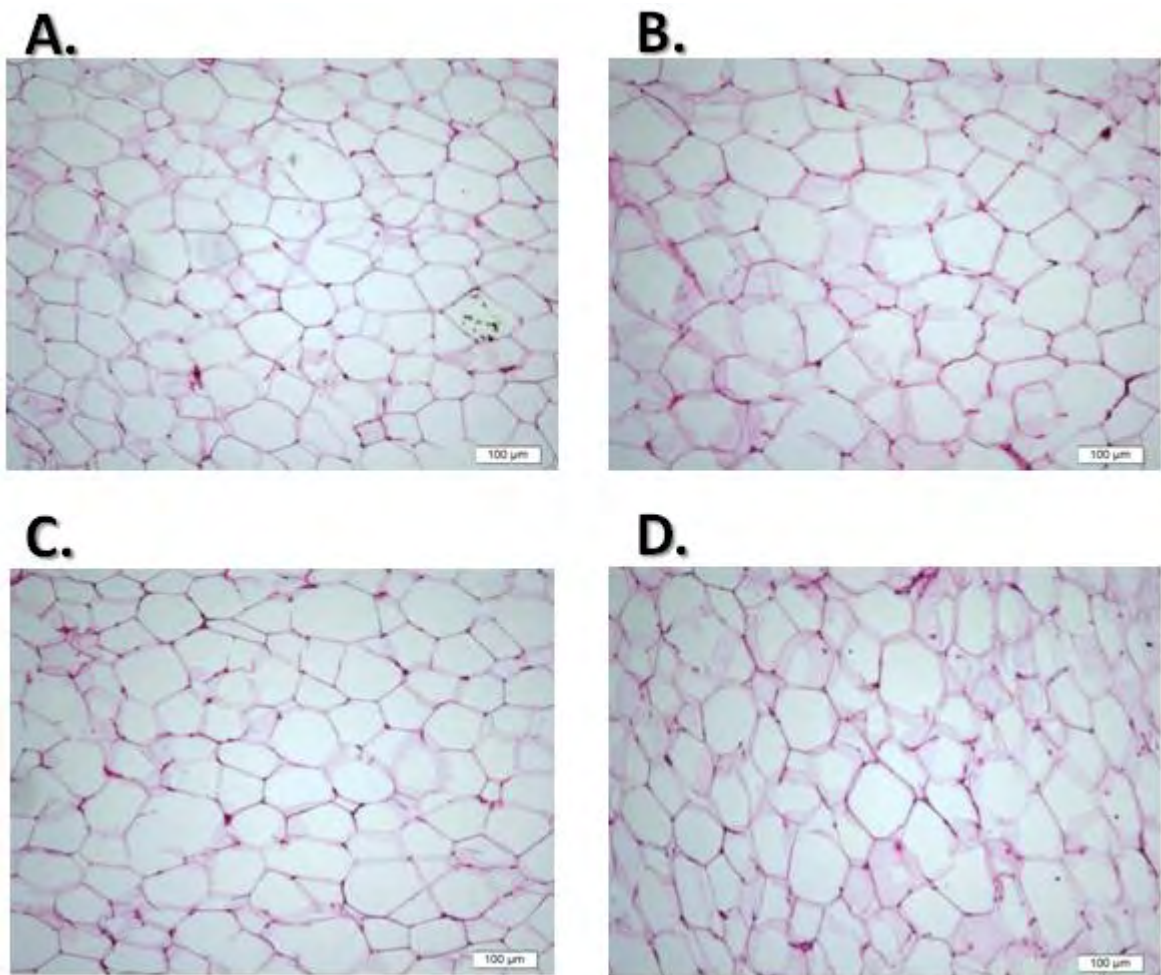
**Figura 16. Perfil lipídico de las crías macho F<sub>1</sub> a los 110 d.** Se informa la concentración de **A**. Triglicéridos y **B**. Colesterol en suero, respectivamente. Los datos se muestran como Media ± EE,  $n= 8$  ratas por grupo experimental. Grupos que no comparten al menos una misma letra son estadísticamente diferentes ( $p<0.05$ ).



## 8.6. *Parámetros de adiposidad a los 110 d*

### 8.6.1. *Tamaño del adipocito*

En las micrografías digitales tomadas a partir de los cortes histológicos del TAR, teñidos por la técnica de HE observadas a 10X en microscopio de campo claro (Figura 17), se cuantificó el tamaño del adipocito mediante un software AxioVision40 V 4.8.2.0. y se analizó la distribución de frecuencias de cada grupo experimental de las crías macho F<sub>1</sub> a los 110 días de edad.



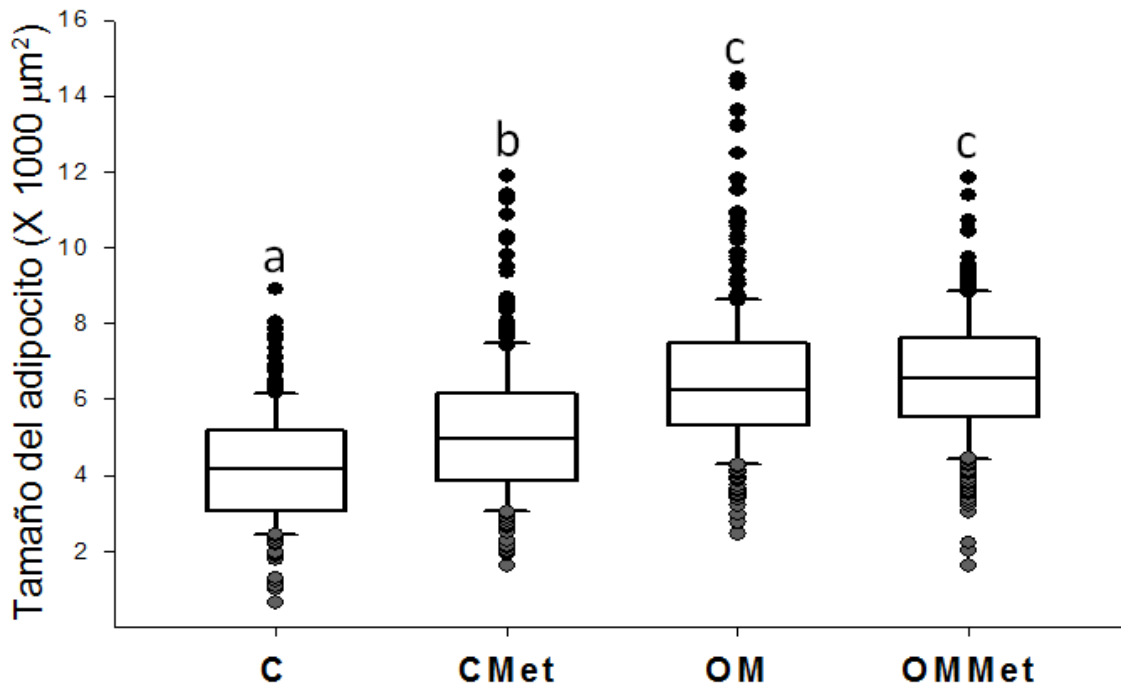
**Figura 17. Micrografías de tejido adiposo retroperitoneal de las crías macho F<sub>1</sub> a los 110 d.** Cortes histológicos teñidos en HE observadas a 10X, correspondientes a los cuatro grupos experimentales: **A.** Grupo C, **B.** Grupo OM, **C.** Grupo CMet y **D.** Grupo OMMet.

Se observó una gran heterogeneidad en el tamaño del adipocito en los cortes histológicos (Figura 17), incluso se comprobó que los datos no siguen la distribución normal (o de Gauss) mediante la prueba normalidad de Shapiro-Wilk, motivo por el cual se empleó la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis (prueba basada en la mediana) para comparar diferencias de tamaño entre los grupos experimentales.

En las crías macho de 110 d, la mediana del tamaño de los adipocitos (Figura 18) en el grupo OM presentó un aumento significativo respecto al grupo C, de igual forma, el grupo CMet aumentó significativamente su tamaño comparado al grupo C. No obstante, el grupo OMMet no mostró cambio respecto al grupo OM.

Sin embargo, el grupo OM presenta una mayor dispersión en el tamaño del adipocito ya que se observaron áreas de más de  $14\ 000\ \mu\text{m}^2$ , mientras que en el grupo OMMet no se observaron adipocitos mayores de  $12\ 000\ \mu\text{m}^2$ . A pesar de que no hay cambios en el tamaño de la mediana (percentil 50) entre estos dos grupos, los cambios de tamaño se pueden ver reflejados por arriba del percentil 90.

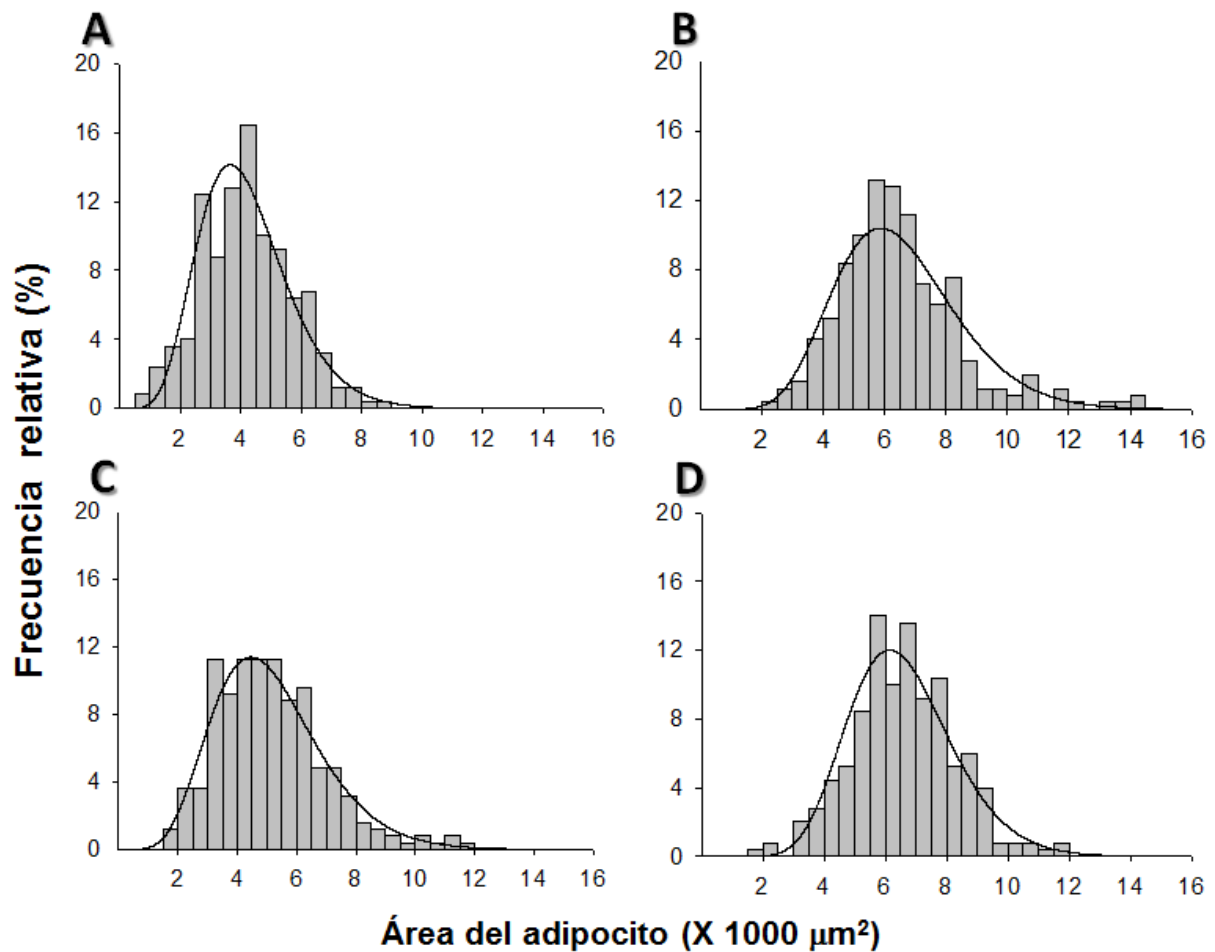
### MACHOS



**Figura 18.** Área del adipocito medida en las micrografías de las crías macho  $F_1$  a los 110 d. Datos mostrados como mediana (líneas centrales horizontales), percentiles 75 y 25 (cajas grises) y percentiles 90 y 10 (barras de error “bigotes”),  $n= 250$  adipocitos por grupo experimental. Letras distintas denotan diferencias significativas ( $p<0.05$ ) por la prueba Kruskal-Wallis.

Además de las diferencias de las medianas del tamaño del adipocito entre los grupos experimentales, es evidente que la dispersión de los datos entre los grupos no muestran uniformidad (Figura 18), por lo que la distribución de frecuencia se analizó gráficamente mediante la construcción de histogramas de frecuencia relativa, utilizando categorías correspondientes a intervalos de  $500 \mu\text{m}^2$  (valor establecido mediante la Ecuación 6), en las crías macho experimentales a los 110 d.

## MACHOS

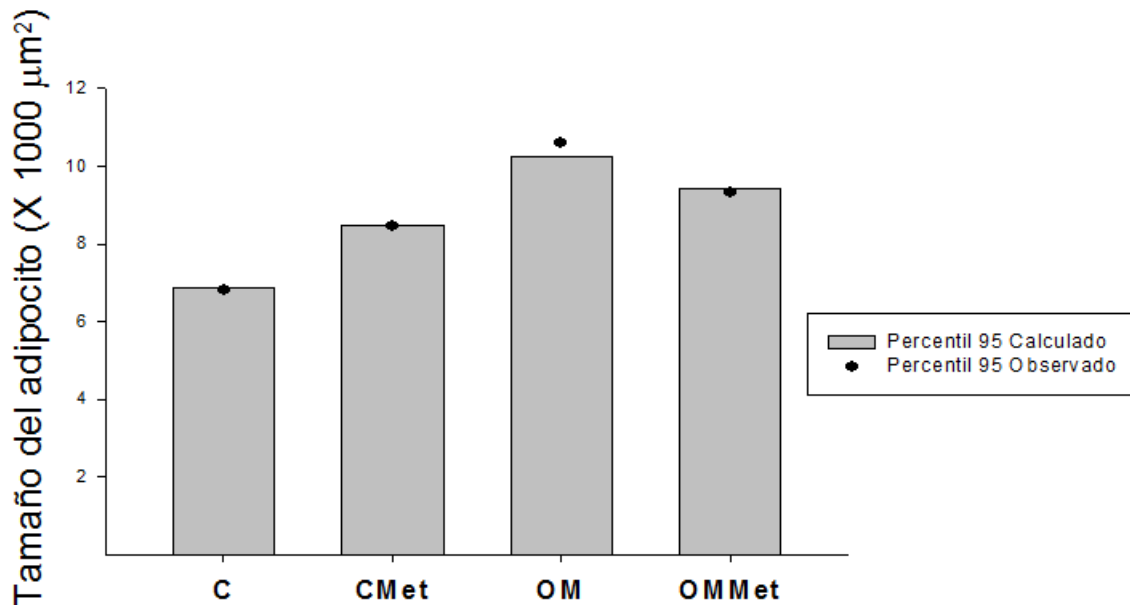


**Figura 19. Distribución del tamaño del adipocito de las crías macho  $F_1$  a los 110 d.** Histograma de frecuencias relativas (barras grises) y función de densidad de probabilidad gamma (línea continua) con los parámetros de cada grupo experimental: **A.** Grupo C, **B.** Grupo OM, **C.** Grupo CMet y **D.** Grupo OMMet. Prueba de Bondad de ajuste estadísticamente significativa (Prueba de  $\chi^2$ ),  $p > 0.05$

Gráficamente y mediante la prueba de  $\chi^2$ , se comprueba que la función de densidad de probabilidad de la distribución gamma (Ecuación 7) es un modelo matemático adecuado para la distribución del tamaño del adipocito en cada grupo experimental de las crías macho a los 110 d (Figura 19) (Ibáñez Chávez 2014).

Mediante la función inversa de la Distribución Gamma (Ecuación 10) y los parámetros correspondientes a cada grupo experimental, se calculó el tamaño del adipocito correspondiente al percentil 95. Asimismo, se comparó el valor calculado con el valor observado, sin observarse diferencias mayor al 3.3% entre ambos valores. Es posible percibir que el grupo OM tiene un valor más elevado respecto al grupo C, de igual forma, el grupo CMet presenta un valor elevado respecto al grupo C. Lo anterior sugiere que el tamaño de los adipocitos más grandes en el grupo OMMet se redujo respecto al tamaño de los adipocitos del grupo OM (Figura 20).

## MACHOS



**Figura 20. Tamaño del adipocito en el percentil 95 de las crías macho  $F_1$  a los 110 d.** Se representan el percentil 95 calculado (barras grises) y observado (puntos negros) en cada grupo experimental,  $n= 250$  adipocitos.

## 9. DISCUSIÓN

En 2006, entre las mujeres mexicanas de 20 a 49 años (edad reproductiva), la prevalencia de obesidad fue 34.5% y sobrepeso de 37.4% (ENSANUT 2006). Para el año 2012, el sobrepeso disminuyó 5.1% y la obesidad aumentó 2.9%, mientras que en el 2016, el sobrepeso se mantuvo y la prevalencia de obesidad aumentó 5.4% (ENSANUT-MC 2016, ENSANUT 2012). La obesidad es un desequilibrio energético entre las calorías consumidas y gastadas (OMS, 2012), que propician el aumento de peso corporal, ya que el exceso de calorías se almacena en forma de grasa depositándose en el tejido adiposo (Galic et al 2010). La obesidad materna no sólo afecta a la mujer que la padece, sino que también impacta en la salud de sus descendientes a largo plazo (Nelson et al 2010).

La obesidad previa al embarazo es un factor negativo tanto para la progeñie como para la madre, quien se encuentra en un estado metabólicamente alterado al que se le sumarán los cambios hormonales y metabólicos producidos por la gestación (Brown 2014).

La obesidad materna durante la gestación promueve la activación de ciertos procesos metabólicos inflamatorios, caracterizados por el incremento de grasa visceral y los niveles de citoquinas proinflamatorias sistémicas y la acumulación de macrófagos en el mismo tejido (Basu et al 2011, Madan et al 2009), así también como la generación de radicales libres y estrés oxidante (Alfaradhi & Ozanne 2011); estas alteraciones desencadenan el desarrollo de resistencia a la insulina (Harris et al 2016), diabetes gestacional, hiperinsulinemia, hiperlipemias e hipertensión gestacional (Brown 2014, Lozano-Bustillo et al 2016).

Durante el embarazo y la lactancia, los requerimientos energéticos aumentan a causa de que el gasto energético basal incrementa por los procesos de crecimiento uterino, placentario y fetal, mientras que en la lactancia se necesita energía para la producción y secreción de leche materna (Brown 2014).

Sobre este contexto, se ha observado, en modelos de obesidad materna, que los efectos metabólicos adversos ocasionados por la dieta alta en grasa preceden a los cambios detectables en el peso corporal materno (McDonald et al 2011), así como el incremento en la cantidad de grasa corporal, al cual se le ha asociado con una mayor resistencia a la insulina (Jung & Choi 2014).

Recientemente, el uso de la Met durante el embarazo se ha vuelto cada vez más popular. De acuerdo a la Food and Drug Administration (FDA), la Met es un fármaco de categoría B (no presenta efectos teratogénicos) (Costello & Eden 2003, Nawaz et al 2008, Thessaloniki 2008) el cual puede ser utilizado como tratamiento seguro y económico para la prevención de complicaciones del embarazo, tales como riesgo de aborto, preeclampsia, restricción del crecimiento fetal y nacimientos prematuros sin afectar la salud materna (Palomba et al 2015). Como otra consecuencia, en humanos, se reduce la resistencia a la insulina y facilita la prevención primaria y secundaria de la DG (Nawaz et al 2008).

En sí, la Met se recomienda con el objetivo de prevenir las complicaciones presentes durante el embarazo, en especial a mujeres con síndrome de ovario poliquístico (El Hameed et al 2011). Adicionalmente, mejora el ambiente metabólico de la madre gestante.

En este estudio experimental con rata *Wistar*, se utilizó una dosis de 300 mg de metformina/día/kg peso corporal, la cual fue administrada un mes previo y durante la gestación en las F<sub>0</sub> experimentales. En un modelo de obesidad materna (Harris et al 2016) similar al nuestro, se empleó esta misma dosis en ratas obesas únicamente en la etapa de gestación. Sin embargo, dicha dosis resulta ser una dosis intermedia entre una dosis baja (200 mg/d/kg p.c.) y una dosis moderada (400 mg/kg/p.c.) de Met evaluadas previamente en ratas con diabetes (Li et al 2016).

## **Madres experimentales F<sub>0</sub>**

En el modelo experimental del presente estudio, la dieta alta en grasa produjo una diferencia significativa en el peso corporal del grupo F<sub>0</sub> OM a partir del día 84 de edad, con respecto al grupo F<sub>0</sub> C antes del apareamiento. Estos resultados son compatibles con lo que ya se ha descrito en nuestra línea de trabajo, en donde roedores de tan sólo cuatro semanas de alimentación con dieta obesogénica, se observa un aumento significativo en la acumulación de grasa corporal (Vega et al 2015, Zambrano et al 2010, Zambrano & Nathanielsz 2013).

Con base en los resultados obtenidos en la curva de crecimiento materno, previo al apareamiento, se puede aseverar que mediante la alimentación, es posible inducir un fenotipo compatible con la obesidad en ratas hembras a través de la ingesta de una dieta alta en grasa (McDonald et al 2011).

Asimismo, es posible que, a pesar de que no existan diferencias significativas (antes de los 84 día de edad, etapa comprendida en el periodo prenatal) en el peso corporal materno previo al apareamiento, la composición corporal pueda ser diferente entre los grupos experimentales, debido a que probablemente la dieta alta en grasa incrementó la cantidad de grasa corporal materna.

Se sabe que los cambios metabólicos de la dieta alta en grasa preceden al aumento de peso corporal, debido a esta posibilidad y con el fin de prevenirlo, se inició la administración oral de Met un mes previo al apareamiento; dicha intervención no produjo cambios en el peso corporal materno en las hembras alimentadas con dieta control (F<sub>0</sub> CMet), ni en las alimentadas con dieta alta en grasa (F<sub>0</sub> OMMet), por lo que es posible mantener la adiposidad excesiva con un agente antihiper glucemiante como lo es la Met, cuyo fin es obtener un mejor control de la glicemia materna, antes y durante la etapa de gestación sin modificar el peso corporal materno.

Se observó, entre las madres C y las madres OM, que la tendencia en que ocurrió la ganancia de peso corporal aumenta gradualmente durante la gestación, acelerándose más conforme se acerca el parto, en donde las madres OM tuvieron un mayor peso corporal significativo respecto a las madres C. Sin embargo, la ganancia de peso no

parece modificarse por el tratamiento con metformina, aunque el peso corporal materno arranca más alto por parte de las madres OMMet al inicio de la gestación.

En los tres primeros días de lactancia, el peso corporal materno fue significativamente diferente entre los grupos OM y OMMet respecto a los grupos C y CMet. Posteriormente, se observó una reducción gradual del peso corporal en el grupo OM hasta alcanzar un comportamiento similar al grupo C en el resto de dicha etapa. Esta disminución tiene una implicación importante, ya que la reducción de peso corporal materno puede estar ligada al incremento en la concentración de lípidos en la leche a expensas de la movilización de la grasa corporal materna, alterando la alimentación de los descendientes en la etapa de la lactancia (Bautista-Carbajal 2013, Bautista et al 2016), siendo este un factor de programación sobre la descendencia.

A lo largo de la lactancia, las madres experimentales no se intervinieron con Met, es interesante señalar que los efectos benéficos de este agente hiperglucemiante se pueden reflejar aún después de haber concluido el tratamiento farmacológico en el metabolismo materno.

Al término de esta etapa (21 días después del parto), en el presente estudio, los parámetros metabólicos en madres obesas intervenidas con Met, fueron cuantificados observándose efectos positivos en la glicemia (glucosa) y el IRI, parámetros que se redujeron significativamente respecto a las madres OM, las cuales desarrollaron hiperglicemia y un mayor IRI comparadas con las madres C, tales alteraciones mencionadas se atribuyen a la dieta alta en grasa ingerida a lo largo de su vida.

Se observó que la Met tuvo un efecto a largo plazo para la prevención de la RI (hiperglicemia), condición metabólica que se da de forma gradual. Este hallazgo sirve como protocolo a realizar intervenciones maternas sólo previas a la gestación.

Otro efecto positivo que se observó a consecuencia de esta biguanidina fue el efecto sobre la concentración de insulina, cuya función es aumentar la sensibilidad de los receptores de insulina a nivel celular (Martindale & Westcott 2008), y la cual no presentó diferencias significativas entre las madres F<sub>0</sub> experimentales, sólo el hecho de que las madres OM secretan mayor insulina que el resto de ellas.



Al parecer la intervención con Met previa y durante la gestación, también tuvo un efecto benéfico en el perfil lipídico de las madres obesas, el cual se mantuvo hasta el final de la lactancia. La concentración de TG en suero se redujo significativamente en el grupo materno OMMet respecto al grupo materno OM. No obstante, no se redujo la cantidad de TA ni la concentración de leptina, cuyo perfil en suero se explica al hecho de que las concentraciones circulantes de dicha hormona polipeptídica son proporcionales a las reservas adiposas del organismo (Rosado et al 2006), además de que continuaron ingiriendo una dieta alta en grasa al término de la lactancia. Resumiendo, el daño metabólico en las madres  $F_0$ , correspondientes al grupo OM, permanece a lo largo de la lactancia a pesar de tener un peso corporal de forma similar al grupo C al término de dicha etapa.

Los cambios en la alimentación de las crías durante la etapa de la lactancia son factores suficientes para programar el metabolismo de la descendencia. En modelos animales, se ha reportado que en camadas reducidas, la ingesta de leche materna en las crías es mayor con respecto a las crías de camadas de tamaño estándar (8 ó 12 crías), observándose diferencias significativas en peso y composición corporal entre los descendientes (Wurtman & Miller 1976). En otro modelo experimental, se ha reportado que, por la técnica de 'cross-fostering' (transferencia de camadas de una madre biológica a una madre adoptiva temporal y viceversa), las crías de madres obesas amamantadas con leche materna control durante la lactancia normaliza las alteraciones metabólicas causadas por la obesidad, tales como el peso corporal, concentración de leptina, perfil lipídico e insulinemia (Miranda et al 2017).

Dentro de este trabajo de investigación, se podría pensar que las crías se programaron a través de la leche materna proveniente de madres OM, quienes, de acuerdo a lo reportado en otros trabajos, producen cantidades mayores de leche con un contenido elevado de lípidos respecto a las madres control (Del Prado et al 1999).

Sin embargo, durante y al término de la lactancia, la reducción del peso corporal materno  $F_0$  aunado con el incremento de TG en este estudio, podría relacionarse con la movilización de grasas a través de la leche materna. Este comportamiento se ha demostrado en perfiles lipídicos de ratas lactando, en los cuales se ha observado un

incremento en las VLDL circulantes, que permanecen hasta tres semanas post-parto (Bosch & Camejo 1967). Esto nos lleva a suponer que los lípidos movilizados en la madre finalmente llegarán a la cría a través de la leche materna, teniendo un efecto negativo sobre la programación del desarrollo de las crías, como se mencionó anteriormente.

## **Crías macho F<sub>1</sub>**

Existe evidencia sustentable de que la obesidad materna produce diversas alteraciones metabólicas a nivel fetal, neonato y en la etapa adulta de su descendencia (Elahi et al 2009, Srinivasan et al 2006b). En el útero, la exposición a un exceso de lípidos maternos puede afectar una serie de rutas en el desarrollo de los órganos, como hígado, músculo esquelético, TA, cerebro y páncreas (Bringhenti et al 2013). Este fenómeno se denomina como “programación fetal” (Bouanane et al 2010).

### **Parámetro al Nacimiento (0 d).**

Varios estudios epidemiológicos y en animales experimentales han demostrado que la restricción materna de nutrientes o la sobrealimentación, así como la obesidad o el consumo de dietas alta en grasa durante el embarazo, predisponen a la descendencia a desarrollar efectos sobre el peso de nacimiento del producto (Berry et al 2013). Por lo que se esperaría que las crías de madres obesas (F<sub>1</sub> OM) presentaran un mayor peso corporal comparadas con las crías de madres control (F<sub>1</sub> C) (Gil Hernández 2010).

Sin embargo, en el presente trabajo, se registró que el peso corporal al nacimiento no presentó diferencias entre los descendientes macho F<sub>1</sub> de los grupos maternos alimentados con dietas distintas (Zambrano et al 2010), lo cual es consistente con los resultados obtenidos en diversos modelos experimentales diseñados para el estudio de los efectos de la dieta materna en la programación del desarrollo (Armitage et al 2005, Shankar et al 2008, Zambrano et al 2010).

Aunque el peso corporal no haya variado, se pueden inferir dos situaciones. La primera, que la composición corporal al nacimiento puede ser diferente aún con un mismo peso corporal o, la segunda, que efectivamente, no hayan ocurrido cambios o nada en la descendencia, considerándose dicho parámetro posiblemente como una medición pobre de la calidad del ambiente intrauterino.

No obstante, se puede concluir que el peso corporal no es necesariamente alterado en las crías programadas por la obesidad materna.

### **Parámetros a los 110 d**

Varios estudios en animales, han descrito que la obesidad materna está asociada a la hiperfagia mediante la regulación de la programación del apetito, en su descendencia (Mühlhäusler 2007, Samuelsson et al 2008). En el caso contrario del peso corporal, se han informado efectos variables propiciados por la obesidad materna (Desai et al 2013).

En este estudio experimental, a los 110 d, no se observaron cambios significativos en el peso corporal ni en la ingesta de alimento entre los cuatro grupos experimentales macho F<sub>1</sub>: C, CMet, OM y OMMet, respectivamente. Sin embargo, sí se detectó un incremento significativo en la adiposidad, es decir, existe una desregulación metabólica en las crías macho provenientes de madres obesas. La intervención materna con Met no tuvo efecto sobre estos parámetros evaluados en la descendencia adulta joven.

Estudios en roedores, sugieren que la obesidad materna está asociada al aumento de adiposidad (acumulación de grasa) en su progenie dentro de la etapa adulta. Con base en los resultados experimentales en este estudio, los machos OM desarrollaron un incremento en la adiposidad respecto a los machos C. Este efecto se atribuye a la exposición de la obesidad materna, la cual está relacionada a la programación de genes importantes para la diferenciación y función de los adipocitos (Bayol et al 2008, Nivoit et al 2009).

Por esta razón, se podría decir que las madres obesas que continuaron alimentándose con dieta alta en grasa a lo largo de su vida hasta la lactancia, influyó posiblemente en

la adipogénesis de su descendencia macho. La adipogénesis es el proceso del desarrollo de precursores de células madres que producen tanto la proliferación como la diferenciación de los preadipocitos (Ailhaud et al 1992).

Por otra parte, la cantidad de leptina circulante está altamente correlacionada con la adiposidad, dado que éste expresa numerosos factores que pueden estar implicados en la modulación de la adipogénesis (Park et al 2004). La cuantificación de leptina nos señala de forma indirecta si las crías presentan más cantidad de grasa corporal, ya que a mayor contenido de TA mayor producción y secreción de leptina (Rosado et al 2006).

En la literatura científica se ha descrito que las alteraciones en los mecanismos centrales del gasto energético, juegan un papel importante en el desarrollo de la obesidad. La insulina y la leptina normalmente controlan la ingesta de alimento a través de sus receptores en el núcleo arcuato hipotalámico (ARC) (Bouret & Simerly 2006).

En la rata, la obesidad materna inducida por una dieta alta en grasa antes y durante la gestación, altera la señalización de la leptina y la expresión de péptidos orexigénicos y anorexigénicos (aumentan y disminuyen la ingesta de alimento, respectivamente) en el hipotálamo fetal de la cría (Gupta et al 2009).

Con base en los resultados obtenidos, el IA y la concentración de leptina en suero de las crías F<sub>1</sub> macho, se aprecia que el grupo OM presentó una acumulación de grasa corporal significativamente mayor respecto al grupo C; un comportamiento de forma similar con la concentración de leptina en las crías provenientes de madres obesas, lo cual concuerda con lo ya reportado (Rosado et al 2006).

Este incremento del IA en las crías OM, normalmente se le atribuye a una elevada ingesta de alimento. Sin embargo, todos los grupos experimentales de este estudio, comieron la misma cantidad de alimento (dieta control) después del destete hasta los 110 d, por lo que las crías OM no desarrollaron hiperfagia a diferencia de cómo lo reportan otros investigadores (Matthews et al 1985, Mühlhäusler 2007, Samuelsson et al 2008)).

Este efecto propio de la obesidad materna se justifica a que las crías macho OM se programaron para desarrollar hiperleptinemia, es decir, la acumulación de grasa corporal

aumentó significativamente, así como la concentración de leptina en suero, la cual a mayores concentraciones se hubiese inhibido el apetito, caso que no fue así, ya que los machos OM no redujeron su ingesta, sino que se tornaron resistentes a la leptina (Scarpace & Zhang 2009).

Sin embargo, la intervención materna con Met previo y durante el embarazo, redujo parcialmente el efecto de la obesidad materna sobre la adiposidad y la concentración de leptina en suero, en los machos OMMet con respecto a los machos OM.

Otro factor a considerar, relacionado con la adiposidad, es el tamaño celular, en este caso, el tamaño del adipocito.

La obesidad materna promueve la acumulación excesiva de grasa corporal en la proge, predisponiéndola a la obesidad en la vida adulta (Segovia et al 2014, Zambrano & Nathanielsz 2013). A nivel celular, se ha observado que a partir de la ingesta alimentaria constante de un exceso de energía esto repercute en que los adipocitos desarrollen hipertrofia debido a la necesidad de satisfacer ese almacenamiento de energía incrementada (Salans et al 1973).

Se sabe que el TA secreta un amplio rango de factores bioactivos denominados adipocinas (Ouchi et al 2003), las cuales tienen un rango de papeles fisiológicos esenciales que comprenden la diferenciación del adipocito, metabolismo de glucosa y lípidos, saciedad, regulación inmunitaria, función cardiovascular y función neuroendocrina. La alteración en la secreción de las adipocinas causa una alteración en la comunicación con otros órganos y contribuye al desarrollo de alteraciones inducidas por la obesidad tales como RI y SM (Ouchi et al 2003).

El TA está compuesto, principalmente, de preadipocitos y adipocitos, con pocos leucocitos inflamatorios en individuos sanos. Durante la obesidad, la composición, el fenotipo y la función del TA son alterados. La persistente captación de energía en exceso causa que el TA experimente hipertrofia (incremento del volumen del adipocito) en un intento por cumplir las necesidades de almacenamiento de energía. La obesidad hipertrófica se asocia en su mayoría a una obesidad abdominal, relacionándose a una mayor RI, así como el riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo II y enfermedades

cardiovasculares (Jung & Choi 2014). Considerando todo lo anterior, se puede inferir, en este estudio, que las crías de madres obesas desarrollaron mayor RI.

La acumulación de TG conlleva a la expansión del TA, que se combina con la inflamación crónica local en forma de filtración por las células inmunes. Clásicamente, la inflamación se considera un proceso negativo y perjudicial en la regulación del metabolismo, especialmente para la inhibición de la función del TA y la inducción de la RI (Wang & Ye 2015).

Se cree que algunos aspectos del metabolismo como la RI (McLaughlin et al 2007, Yang et al 2012) y la secreción de adipocinas (Skurk et al 2007) dependen de una distribución precisa del tamaño del adipocito, más que del tamaño promedio de las células.

Dentro del grupo de investigación, se ha comprobado que la obesidad materna programa la hipertrofia del adipocito en la progenie (Zambrano & Nathanielsz 2013), por lo cual en este modelo experimental se decidió evaluarlo nuevamente, en las crías macho F<sub>1</sub> experimentales de 110 d, con el fin de observar si la intervención materna con Met produciría algún cambio significativo en la distribución del tamaño del adipocito.

Tanto en el diagrama de cajas y bigotes como en los histogramas de frecuencia relativa, se confirma experimentalmente, lo que anteriormente se había descrito. Con base en las medianas, se observa que el grupo macho OM presentó un aumento significativo en el tamaño del adipocito comparado con el grupo macho C, es decir, el adipocito desarrolló hipertrofia ocasionada por la obesidad materna. Si bien, el tamaño medio del adipocito no presentó diferencias significativas entre los grupos macho OM y OMMet, se observa en los valores extremos (puntos mayores al percentil 90) que la intervención con Met en las madres obesas fue capaz de reducir el tamaño de los adipocitos más grandes en las crías OMMet. Esto conlleva a implicaciones metabólicas y fisiológicas muy importantes dado que los adipocitos de mayor tamaño están asociados a una alta secreción de citoquinas proinflamatorias, estrés oxidante y RI (Jung & Choi 2014, Klöting & Blüher 2014, Segovia et al 2014).

Cabe señalar que, dentro del estudio, este parámetro fue el único en el que la intervención materna con Met tuvo un efecto negativo sobre el grupo CMet, dado que se

observó un incremento significativo en el tamaño del adipocito respecto al grupo C. Una posible causa que explicaría este resultado sería que, durante la lactancia, las madres CMet tuvieron una baja producción de leche materna, la cual programó negativamente a su descendencia al no proveerle los nutrientes adecuados a través de ésta. Dentro de nuestro equipo de trabajo, se reportan efectos similares en modelos experimentales con restricción proteínica materna (Guzmán et al 2014, Reyes-Castro et al 2012).

De acuerdo a la distribución de tamaño del adipocito, en este estudio, representada gráficamente por medio de histogramas de frecuencia relativa, se observó en los cuatro grupos experimentales, presentan una distribución sesgada a la derecha, donde la moda y la mediana son menores a la media aritmética haciéndola asimétrica, lo cual no se ajusta a la distribución normal, sino a la función de densidad de probabilidad gamma (FDP gamma; Ecuación 7).

En los histogramas de frecuencia, con base en la distribución gamma, se observa que la dispersión de los datos es mayor en crías OM respecto a crías C, ya que se puede apreciar cómo la curva del grupo OM se desplaza a la derecha, es decir, a valores más grandes del tamaño del adipocito. Mientras que la curva correspondiente al grupo OMMet presenta una menor dispersión en comparación al del grupo OM. Esta tendencia coincide con los valores extremos, ubicados en los percentiles 90 y 10, del diagrama de cajas. Esto señala, de forma representativa, que el tamaño del adipocito en los descendientes obesos de madres intervenidas con Met previo y durante la gestación, sí presentaron una mejoría en su tamaño.

Los adipocitos son células altamente especializadas que mantienen la homeostasis de la energía del cuerpo regulando el metabolismo de glucosa y de lípidos (Spiegelman & Flier 2001).

En el metabolismo de lípidos, se reporta que la concentración de TG en sangre está asociada, además de la ingesta, al contenido de TA presente en el organismo, el cual a mayor cantidad, mayor liberación de TG circulantes (Berry et al 2013).

En este estudio, la concentración de TG en las crías OM incrementaron de forma significativa respecto a las crías C, esto se cumple con base en la cantidad de TA

presente en los machos OM. No obstante, la intervención materna con Met produjo un valor intermedio de TG en las crías OMMet ya que no fue diferente de los machos C ni de los machos OM.

Por otro lado, el único parámetro del perfil lipídico en el que no se observaron cambios significativos entre los machos experimentales, fue la concentración de colesterol en suero, comportamiento previamente reportado en otros trabajos de la línea de investigación (Zambrano et al 2010). Esta molécula se caracteriza por obtenerse a través de la dieta, sin embargo, no es una forma de almacenamiento energético que origine algún desbalance, ya que bioquímicamente se comporta como componente de membranas celulares y como precursor de hormonas esteroideas y ácidos biliares (Lehninger et al 2008).

Dado que la concentración de TG suelen ser empleados como indicadores de la acumulación intracelular de lípidos, cuya concentración elevada puede provocar un estado de lipotoxicidad, que a su vez puede alterar el metabolismo de la glucosa y de los mismos lípidos.

Se ha demostrado que la dieta de cafetería (en donde se incrementan 17% de grasa y 68% de carbohidratos) materna durante la gestación y la lactancia causa esteatosis hepática en la descendencia adulta. Los crías macho de madres obesas, con este tipo de dieta, muestran un incremento significativo en las concentraciones de glucosa, insulina, leptina, VLDL y lípidos en suero así como la reducción permanente de la  $\beta$ -oxidación hepática y el incremento en la lipogénesis hepática (Bouanane et al 2010).

En cambio, en este estudio experimental, las crías macho OM no desarrollaron hiperglicemia a los 110 d, dado al tipo de dieta que recibieron las madres experimentales en el embarazo y la lactancia, la cual fue una dieta alta en grasa, cuya composición difiere a la dieta de cafetería. Ambas inducen obesidad en la rata, pero sus componentes varían entre sí, la dieta de cafetería comprende de un mayor porcentaje de carbohidratos (56%) que de grasa (18.7%) (Higa et al 2014) comparada con la dieta alta en grasa, (42% y 25%, respectivamente (Zambrano et al 2010)). Por esta razón las crías macho obesas de madres alimentadas con dieta de cafetería desarrollan intolerancia a la glucosa,



mientras que las crías macho obesas de madres alimentadas con dieta alta en grasa induce a mayores cambios en el perfil lipídico.

Como ya se mencionó, la obesidad materna está asociada al desarrollo de la hiperinsulinemia en su descendencia (Samuelsson et al 2008). Esta programación predispone a los islotes pancreáticos a generar una mayor secreción de insulina (Srinivasan et al 2006a, Zambrano et al 2016), cuyo efecto se observa en el incremento de la concentración de insulina en las crías macho OM de este estudio experimental.

La resistencia a la insulina inducida por la obesidad es un factor de riesgo conocido para el desarrollo de la diabetes mellitus tipo II, enfermedades cardiovasculares y otras enfermedades crónicas, esto debido a la citoquinas derivadas de los adipocitos como TNF- $\alpha$ , la cual ha demostrado inducir la RI (Picchi et al 2006). Este parámetro metabólico se presentó de forma incrementada significativamente en la descendencia adulta joven de madres obesas comparadas con la descendencia de madres control.

En este estudio, la obesidad materna produjo cambios en el metabolismo de carbohidratos, donde las crías OM desarrollaron hiperinsulinemia con normoglicemia y RI. Sin embargo, la intervención con Met en madres obesas tuvo un efecto en la concentración de insulina e del IRI de las crías OMMet al obtener valores intermedios entre el grupo C y OM, pero, sin cambios en la glucosa.

La Met es un fármaco antidiabético cuya función principal es disminuir la gluconeogénesis hepática (Pernicova & Korbonits 2014). Se reporta que esta molécula tiene la capacidad de cruzar la placenta (Charles et al 2006) por lo cual ésta podría afectar o actuar sobre el metabolismo tanto materno como del feto.

En un estudio reciente (Harris et al 2016), se reporta que la Met (300 mg/d/kg p.c.), administrada durante la gestación en madres obesas, atenuó algunas alteraciones metabólicas, propiciadas por la obesidad materna, en su descendencia. La exposición fetal a la metformina redujo la cantidad de AG y de marcadores proinflamatorios a nivel hepático (19 d de gestación).

Los hallazgos experimentales de dicho estudio, denotaron que el tratamiento con Met tiene un efecto antiinflamatorio en el hígado fetal, el cual puede producir cambios benéficos a largo plazo, sugiriendo una programación positiva a nivel hepático.

Con base en las evidencias descritas anteriormente, dentro de nuestro estudio, se podría especular, que las madres obesas intervenidas con Met antes y durante el embarazo, programaron de forma directa al feto y sus órganos, en especial: el hígado. Como bien se sabe, el hígado es el órgano por excelencia que, en general, controla en gran medida el metabolismo de lípidos, lo cual concuerda al existir un mejor manejo de los TG en las crías macho OMMet, cuyas concentraciones disminuyen parcialmente, así como la reducción en el tamaño excesivo de los adipocitos. Sin embargo, al no existir cambios de reducción en el tamaño medio del adipocito en el grupo OMMet respecto al grupo OM, esto nos señala que la programación del adipocito no es modificado por la intervención materna con Met como se esperaba.

Dicho esto, la Met tiene un efecto benéfico en mejorar el metabolismo hepático, tanto de carbohidratos como de lípidos tanto en las crías como en la madre obesa. Mas no a nivel de TA, el cual puede estar compensando un poco la hipertrofia de este tejido.

# CONCLUSIÓN

El control de la glicemia a través de la intervención con Met, un mes previo y durante la gestación en madres obesas, es capaz de contrarrestar, en parte, algunos de los efectos adversos propiciados por la obesidad materna, en el metabolismo de lípidos y glucosa tanto de la descendencia como de la propia madre.

Sin embargo, la programación en el metabolismo de lípidos y glucosa es multifactorial por lo que la intervención con Met necesitaría complementarse con cambios en el estilo de vida para observar efectos significativos.

# REFERENCIAS

- Ailhaud G, Grimaldi P, Negrel R. 1992. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annual Review of Nutrition* 12: 207-33.
- Alfaradhi M, Ozanne S. 2011. Developmental programming in response to maternal overnutrition. *Frontiers in genetics* 2: 27.
- American Diabetes Association. 2003. Gestational diabetes mellitus. *Diabetes care* 26: s103-s05.
- Armitage JA, Taylor PD, Poston L. 2005. Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy rich diet during development. *The Journal of Physiology* 565: 3-8.
- Babick F, Ullmann C. 2016. Error propagation at the conversion of particle size distributions. *Powder Technology* 301: 503-10.
- Bailey CJ, Turner RC. 1996. Metformin. *The New England Journal of Medicine* 334: 574-9.
- Basu S, Haghiac M, Surace P, Challier JC, Guerre-Millo M, et al. 2011. Pregravid obesity associates with increased maternal endotoxemia and metabolic inflammation. *Obesity* 19: 476-82.
- Bautista-Carbajal CJ. 2013. *Efecto de la restricción proteínica durante la gestación y/o lactancia sobre los mecanismos de síntesis y metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en la rata*. UNAM. 189 pp.
- Bautista CJ, Montano S, Ramirez V, Morales A, Nathanielsz PW, et al. 2016. Changes in milk composition in obese rats consuming a high-fat diet. *The British Journal of Nutrition* 115: 538-46.
- Bayol S, Simbi B, Bertrand J, Stickland N. 2008. Offspring from mothers fed a 'junk food' diet in pregnancy and lactation exhibit exacerbated adiposity that is more pronounced in females. *The Journal of Physiology* 586: 3219-30.
- Berry DC, Stenesen D, Zeve D, Graff JM. 2013. The developmental origins of adipose tissue. *Development* 140: 3939-49.
- Bosch V, Camejo G. 1967. Serum lipoproteinemia in pregnant and lactating rats. *Journal of Lipid Research* 8: 138-41.
- Bouanane S, Merzouk H, Benkalfat NB, Soulimane N, Merzouk SA, et al. 2010. Hepatic and very low-density lipoprotein fatty acids in obese offspring of overfed dams. *Metabolism: clinical and experimental* 59: 1701-09
- Bouret S, Simerly R. 2006. Developmental programming of hypothalamic feeding circuits. *Clinical genetics* 70: 295-301
- Bringhenti I, Moraes-Teixeira JA, Cunha MR, Ornellas F, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. 2013. Maternal obesity during the preconception and early life periods alters pancreatic development in early and adult life in male mouse offspring. *PLOS ONE* 8: e55711.
- Brown JE. 2014. *Nutrición en las diferentes etapas de la vida*. McGraw-Hill Mexico. 600 pp.
- Castro-Martínez M, Castillo-Anaya V, Ochoa-Aguilar A, Godínez-Gutiérrez SA. 2014. La metformina y sus aplicaciones actuales en la clínica. *Medicina Interna de México* 30: 562-74.

- Cinti S. 2007. The adipose organ In *Adipose tissue and adipokines in health and disease*, pp. 3-19: Springer.
- Costello MF, Eden JA. 2003. A systematic review of the reproductive system effects of metformin in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility* 79: 1-13.
- Charles B, Norris R, Xiao X, Hague W. 2006. Population pharmacokinetics of metformin in late pregnancy. *Therapeutic drug monitoring* 28: 67-72.
- Chu SY, Callaghan WM, Kim SY, Schmid CH, Lau J, et al. 2007a. Maternal obesity and risk of gestational diabetes mellitus. *Diabetes care* 30: 2070-76.
- Chu SY, Kim SY, Lau J, Schmid CH, Dietz PM, et al. 2007b. Maternal obesity and risk of stillbirth: a metaanalysis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 197: 223-8.
- Daugan M, Dufaÿ Wojcicki A, d'Hayer B, Boudy V. 2016. Metformin: An anti-diabetic drug to fight cancer. *Pharmacological Research* 113, Part A: 675-85.
- Del Prado M, Villalpando S, Gordillo J, Hernandez-Montes H. 1999. A high dietary lipid intake during pregnancy and lactation enhances mammary gland lipid uptake and lipoprotein lipase activity in rats. *Journal of Nutrition* 129: 1574-8.
- Desai M, Beall M, Ross MG. 2013. Developmental origins of obesity: programmed adipogenesis. *Current Diabetes Reports* 13: 27-33.
- DiGirolamo M, Fine JB, Tagra K, Rossmanith R. 1998. Qualitative regional differences in adipose tissue growth and cellularity in male Wistar rats fed ad libitum. *The American Journal of Physiology* 274: R1460-7.
- El Hameed AAA, Shreif HE, Mowafy HE. 2011. The role of continuing metformin therapy during pregnancy in the reduction of gestational diabetes and improving pregnancy outcomes in women with polycystic ovary syndrome. *Middle East Fertility Society Journal* 16: 204-08.
- Elahi MM, Cagampang FR, Mukhtar D, Anthony FW, Ohri SK, Hanson MA. 2009. Long-term maternal high-fat feeding from weaning through pregnancy and lactation predisposes offspring to hypertension, raised plasma lipids and fatty liver in mice. *British Journal of Nutrition* 102: 514-19.
- ENSANUT-MC. 2016. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016.
- ENSANUT. 2006. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública.
- ENSANUT. 2012. [ENSANUT 2012: Analysis of its main results]. *Salud Pública de México* 55 Suppl 2: S81-2.
- Ferenc J-S, Néda Z. 2007. On the size distribution of Poisson Voronoi cells. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications* 385: 518-26.
- Fernandez-Berges D, Felix-Redondo FJ, Lozano L, Perez-Castan JF, Sanz H, et al. 2011. Prevalence of metabolic syndrome estimated with the new World Health Organization recommendations. The HERMEX study. *Gaceta sanitaria / S.E.S.P.A.S* 25: 519-24.
- Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. 2008. Fixation and permeabilization of cells and tissues. *Cold Spring Harbor Protocols* 2008: pdb top36.
- Foretz M, Viollet B. 2014. New promises for metformin: advances in the understanding of its mechanisms of action. *Medecine Sciences : M/S* 30: 82-92.
- Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. 2010. Adipose tissue as an endocrine organ. *Molecular and Cellular Endocrinology* 316: 129-39.

- García JEG, Kaufer MH, Arroyo P. 2010. *La obesidad. Perspectivas para su comprensión y tratamiento*. Editorial Médica Panamericana. 303 pp.
- Gardner D. 2003. The etiology of obesity. *Missouri Medicine* 100: 242-7.
- Gil Hernández Á. 2010. *Tratado de Nutrición. Tomo 1. Bases fisiológicas y biológicas de la nutrición*. Editorial Médica Panamericana. 992 pp.
- Graham GG, Punt J, Arora M, Day RO, Doogue MP, et al. 2011. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clinical Pharmacokinetics* 50: 81-98.
- Grandi C, Maccarone MB, Luchtenberg G, Rittler M. 2012. La obesidad materna como factor de riesgo para defectos congénitos. *Revista del Hospital Materno Infantil Ramón Sardá* 31: 100-11.
- Gupta A, Srinivasan M, Thamadilok S, Patel MS. 2009. Hypothalamic alterations in fetuses of high fat diet-fed obese female rats. *Journal of Endocrinology* 200: 293-300.
- Guzmán C, García-Becerra R, Aguilar-Medina MA, Méndez I, Merchant-Larios H, Zambrano E. 2014. Maternal protein restriction during pregnancy and/or lactation negatively affects follicular ovarian development and steroidogenesis in the prepubertal rat offspring. *Archives of Medical Research* 45: 294-300.
- Hamed EA, Zakary MM, Ahmed NS, Gamal RM. 2011. Circulating leptin and insulin in obese patients with and without type 2 diabetes mellitus: relation to ghrelin and oxidative stress. *Diabetes Research and Clinical Practice* 94: 434-41.
- Hardie L, Trayhurn P, Abramovich D, Fowler P. 1997. Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. *Clinical Endocrinology* 47: 101-6.
- Harris K, Desai N, Gupta M, Xue X, Chatterjee PK, et al. 2016. The effects of prenatal metformin on obesogenic diet-induced alterations in maternal and fetal fatty acid metabolism. *Nutrition & Metabolism* 13: 55.
- Hernández ÁG. 2010. *Tratado de Nutrición. Tomo IV Nutrición Clínica*. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana. 1032 pp.
- Higa TS, Spinola AV, Fonseca-Alaniz MH, Evangelista FA. 2014. Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology* 6: 47-54.
- Howie GJ, Sloboda DM, Kamal T, Vickers MH. 2009. Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. *The Journal of Physiology* 587: 905-15.
- Ibáñez Chávez CA. 2014. *Beneficio del ejercicio en las crías descendientes de ratas con obesidad experimental*. UNAM. 97 pp.
- Jung UJ, Choi MS. 2014. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *International Journal of Molecular Sciences* 15: 6184-223.
- Kirk SL, Samuelsson AM, Argenton M, Dhonye H, Kalamatianos T, et al. 2009. Maternal obesity induced by diet in rats permanently influences central processes regulating food intake in offspring. *PLoS ONE* 4: e5870.
- Klötting N, Blüher M. 2014. Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 15: 277-87.

- Krishan S, Richardson DR, Sahni S. 2015. Adenosine monophosphate-activated kinase and its key role in catabolism: structure, regulation, biological activity, and pharmacological activation. *Molecular Pharmacology* 87: 363-77.
- Kumar MV, Sunvold GD, Scarpace PJ. 1999. Dietary vitamin A supplementation in rats: suppression of leptin and induction of UCP1 mRNA. *Journal of Lipid Research* 40: 824-9.
- Leddy MA, Power ML, Schulkin J. 2008. The impact of maternal obesity on maternal and fetal health. *Reviews in Obstetrics & Gynecology* 1: 170-78.
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. 2008. *Lehninger principles of biochemistry*. New York: W.H. Freeman.
- Li X, Chen Y, Zhao Z, Lu W, Zhou T. 2016. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Analysis of Metformin using Different Models in Diabetic Rats. *Drug Research* 66: 547-54.
- Loza TMR. 2014. *Intervención con resveratrol en la obesidad materna de la rata: beneficio en el metabolismo de las crías*. UNAM. 67 pp.
- Lozano-Bustillo A, Betancourth-Melendez WR, Turcios-Urbina LJ, Cueva-Nuñez JE, Ocampo-Eguigurems DM, et al. 2016. Sobrepeso y Obesidad en el Embarazo: Complicaciones y Manejo. *Archivos de Medicina*.
- Madan JC, Davis JM, Craig WY, Collins M, Allan W, et al. 2009. Maternal obesity and markers of inflammation in pregnancy. *Cytokine* 47: 61-64.
- Martindale W, Westcott WW. 2008. *The extra pharmacopœia of unofficial drugs and chemical and pharmaceutical preparations*. London ; Grayslake, IL: Pharmaceutical Press. viii, 313 p. pp.
- Martínez LEV. 2008. Programación fetal de enfermedades expresadas en la etapa adulta. *Medicina Universitaria* 10: 108-13.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28: 412-9.
- McDonald SD, Pesarchuk E, Don-Wauchope A, El Zimaity H, Holloway AC. 2011. Adverse metabolic effects of a hypercaloric, high-fat diet in rodents precede observable changes in body weight. *Nutrition Research* 31: 707-14.
- McLaughlin T, Sherman A, Tsao P, Gonzalez O, Yee G, et al. 2007. Enhanced proportion of small adipose cells in insulin-resistant vs insulin-sensitive obese individuals implicates impaired adipogenesis. *Diabetologia* 50: 1707-15.
- Megyesi C, Samols E, Marks V. 1967. Glucose tolerance and diabetes in chronic liver disease. *The Lancet* 290: 1051-56.
- Miranda RA, da Silva Franco CC, de Oliveira JC, Barella LF, Tófolo LP, et al. 2017. Cross-fostering reduces obesity induced by early exposure to monosodium glutamate in male rats. *Endocrine* 55: 101-12.
- Mühlhäusler B. 2007. Programming of the Appetite-Regulating Neural Network: A Link Between Maternal Overnutrition and the Programming of Obesity? *Journal of Neuroendocrinology* 19: 67-72.
- Nathanielsz PW, Ford SP, Long NM, Vega CC, Reyes-Castro LA, Zambrano E. 2013. Interventions to prevent adverse fetal programming due to maternal obesity during pregnancy. *Nutrition Reviews* 71 Suppl 1: S78-87.
- Nawaz FH, Khalid R, Naru T, Rizvi J. 2008. Does continuous use of metformin throughout pregnancy improve pregnancy outcomes in women with polycystic ovarian syndrome? *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 34: 832-37.

- Nelson SM, Matthews P, Poston L. 2010. Maternal metabolism and obesity: modifiable determinants of pregnancy outcome. *Human Reproduction Update* 16: 255-75.
- Nivoit P, Morens C, Van Assche FA, Jansen E, Poston L, et al. 2009. Established diet-induced obesity in female rats leads to offspring hyperphagia, adiposity and insulin resistance. *Diabetologia* 52: 1133-42.
- OMS. 2012. Organización Mundial de la Salud. OMS. Estadísticas Sanitarias Mundiales 2012.
- Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Walsh K. 2003. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Current Opinion in Lipidology* 14: 561-66.
- Palomba S, De Wilde MA, Falbo A, Koster MP, La Sala GB, Fauser BC. 2015. Pregnancy complications in women with polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction Update*: dmv029.
- Panik MJ. 2005. *Advanced Statistics from an Elementary Point of View*. Academic Press. 824 pp.
- Park K-G, Park KS, Kim M-J, Kim H-S, Suh Y-S, et al. 2004. Relationship between serum adiponectin and leptin concentrations and body fat distribution. *Diabetes Research and Clinical Practice* 63: 135-42.
- Pernicova I, Korbonits M. 2014. Metformin--mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nature Reviews. Endocrinology* 10: 143-56.
- Picchi A, Gao X, Belmadani S, Potter BJ, Focardi M, et al. 2006. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces endothelial dysfunction in the prediabetic metabolic syndrome. *Circulation Research* 99: 69-77.
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal of Nutrition* 123: 1939-51.
- Reyes-Castro L, Rodriguez J, Charco R, Bautista C, Larrea F, et al. 2012. Maternal protein restriction in the rat during pregnancy and/or lactation alters cognitive and anxiety behaviors of female offspring. *International Journal of Developmental Neuroscience* 30: 39-45.
- Rosado EL, Monteiro J, Chaia V, Do Lago M. 2006. Efecto de la leptina en el tratamiento de la obesidad e influencia de la dieta en la secreción y acción de la hormona. *Nutrición Hospitalaria* 21: 686-93.
- Rosenfeld CS. 2016. Homage to the 'H' in developmental origins of health and disease. *Journal of developmental origins of health and disease*: 1-22.
- Salans LB, Cushman SW, Weismann RE. 1973. Studies of human adipose tissue. Adipose cell size and number in nonobese and obese patients. *The Journal of Clinical Investigation* 52: 929-41.
- Salas-Salvadó J, Rubio MA, Barbany M, Moreno B, de la Seedo\* GC. 2007. Consenso SEEDO 2007 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Medicina Clínica* 128: 184-96.
- Samuelsson A-M, Matthews PA, Argenton M, Christie MR, McConnell JM, et al. 2008. Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance. *Hypertension* 51: 383-92.
- Scarpace PJ, Zhang Y. 2009. Leptin resistance: a predisposing factor for diet-induced obesity. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 296: R493-R500.



- Segovia SA, Vickers MH, Gray C, Reynolds CM. 2014. Maternal Obesity, Inflammation, and Developmental Programming. *BioMed Research International* 2014: 14.
- Sengier A. 2005. Multifactorial etiology of obesity: nutritional and central aspects. *Revue Medicale de Bruxelles* 26: S211-4.
- Shankar K, Harrell A, Liu X, Gilchrist JM, Ronis MJ, Badger TM. 2008. Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring. *The American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 294: R528-38.
- Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H. 2007. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92: 1023-33.
- Spiegelman BM, Flier JS. 2001. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104: 531-43.
- Srinivasan M, Aalinkeel R, Song F, Mitrani P, Pandya JD, et al. 2006a. Maternal hyperinsulinemia predisposes rat fetuses for hyperinsulinemia, and adult-onset obesity and maternal mild food restriction reverses this phenotype. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 290: E129-E34.
- Srinivasan M, Katewa SD, Palaniyappan A, Pandya JD, Patel MS. 2006b. Maternal high-fat diet consumption results in fetal malprogramming predisposing to the onset of metabolic syndrome-like phenotype in adulthood. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 291: E792-E99.
- Sturges HA. 1926. The choice of a class interval. *Journal of the American Statistical Association* 21: 65-66.
- Tanemura M. 2004. Statistical Distributions of Poisson Voronoi Cells in Two and Three Dimensions. *Forma* 18: 221-47.
- Taylor BA, Phillips SJ. 1996. Detection of obesity QTLs on mouse chromosomes 1 and 7 by selective DNA pooling. *Genomics* 34: 389-98.
- Tessier DR, Ferraro ZM, Gruslin A. 2013. Role of leptin in pregnancy: consequences of maternal obesity. *Placenta* 34: 205-11.
- Thessaloniki EA-SPCWG. 2008. Consensus on infertility treatment related to polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction* 23: 462-77.
- Vega CC, Reyes-Castro LA, Bautista CJ, Larrea F, Nathanielsz PW, Zambrano E. 2015. Exercise in obese female rats has beneficial effects on maternal and male and female offspring metabolism. *International Journal of Obesity* 39: 712-9.
- Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F. 2012. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clinical Science* 122: 253-70.
- Wackerly D, Mendenhall W, Scheaffer RL. 2007. *Mathematical Statistics with Applications*. Nelson Education.
- Wang H, Ye J. 2015. Regulation of energy balance by inflammation: common theme in physiology and pathology. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 16: 47-54.
- Weinsier RL, Hunter GR, Heini AF, Goran MI, Sell SM. 1998. The etiology of obesity: relative contribution of metabolic factors, diet, and physical activity. *The American Journal of Medicine* 105: 145-50.
- Wurtman JJ, Miller SA. 1976. Effect of litter size on weight gain in rats. *The Journal of Nutrition* 106: 697-701.

- Yang J, Eliasson B, Smith U, Cushman SW, Sherman AS. 2012. The size of large adipose cells is a predictor of insulin resistance in first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Obesity* 20: 932-38.
- Yogev YV, Gerard HA. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 2009, 14: 77-84. Elsevier.
- Yu C, Teoh T, Robinson S. 2006. Review article: Obesity in pregnancy. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 113: 1117-25.
- Zambrano E, Martinez-Samayoa PM, Rodriguez-Gonzalez GL, Nathanielsz PW. 2010. Dietary intervention prior to pregnancy reverses metabolic programming in male offspring of obese rats. *The Journal of Physiology* 588: 1791-9.
- Zambrano E, Nathanielsz PW. 2013. Mechanisms by which maternal obesity programs offspring for obesity: evidence from animal studies. *Nutrition Reviews* 71 Suppl 1: S42-54.
- Zambrano E, Sosa-Larios T, Calzada L, Ibáñez CA, Mendoza-Rodríguez CA, et al. 2016. Decreased basal insulin secretion from pancreatic islets of pups in a rat model of maternal obesity. *Journal of Endocrinology* 231: 49-57.
- Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, et al. 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *The Journal of Clinical Investigation* 108: 1167-74.

# ANEXOS

## **Anexo I. Procedimiento para la elaboración de dietas experimentales.**

Los reactivos utilizados para la elaboración de las dietas se enlistan a continuación:

- Caseína libre de vitaminas, de Harlan Teklad
- L-Cistina Diclorhidrato, de Sigma Aldrich
- Mezcla de Minerales AIN-76, de Harlan México S.A. de C.V.
- Mezcla de Vitaminas AIN-93 VX, de Harlan México S.A. de C.V.
- Colina, Clorhidrato de Sigma Aldrich
- $\alpha$ -Celulosa de Sigma Aldrich
- Almidón de maíz de Droguería Cosmopolita S.A. de C.V
- Glucosa Anhidra de Droguería Cosmopolita S.A. de C.V
- Aceite Comestible Puro de Soya Nutrioli® de Ragasa Industrias S.A. de C.V.
- Manteca de cerdo de JC Fortes®
- Azúcar refinada de Great Value®

La dieta fue elaborada de la siguiente manera

1. Se pesó según la formulación mencionada en el texto la cantidad correspondiente de cada componente por separado usando la balanza analítica Sartorius® ED623SCW así como la báscula EURA® 2000/100 (cap. máx.=100 kg y d=50 g), según la sensibilidad requerida en cada caso.
2. Se adicionó primero la cantidad requerida de manteca de cerdo en la mezcladora de paletas y se accionó en velocidad intermedia durante 5 minutos o bien hasta que la manteca se distribuyera uniformemente en el fondo.
3. Se mezclaron todos los componentes sólidos durante 5 minutos en velocidad baja en la mezcladora (siendo las mezclas: de vitaminas AIN-76 y de minerales AIN-93VX las últimas en incorporarse).

4. Después, sin detener el mezclado se agregó la cantidad correspondiente del aceite de soya.
5. A velocidad intermedia se mezcló por 5 minutos más o hasta haber obtenido una masa homogénea de consistencia adecuada para ser roída por los animales y a la vez ser moldeada con las manos.
6. La dieta se almacenó en bolsas de polietileno opacas, por lapsos no mayores a un mes en un cuarto frío de 4°C.

## Anexo II. Especificaciones de la Metformina (FICONAX®).

**Denominación genérica:** Metformina.

**Forma farmacéutica y formulación:** Tabletas. Cada tableta contiene: Clorhidrato de Metformina 850 mg y 1 g. Excipiente cbp una tableta.

**Presentación:** 30 tabletas.



Este producto es hecho en México por: **Laboratorios PiSA, S.A. de C.V.** Av. Miguel Angel de Quevedo No. 555. Col. Romero de Terreros, C.P. 04310, Deleg. Coyoacán. CDMX., México.

**Número de registro del medicamento:** 299M2000 SSA.

**Dosis diaria empleada:** 300 mg de metformina/día/kg de peso corporal como vehículo se usó una solución de carboximetilcelulosa al 0.5%.

### **Anexo III. Técnica estándar de la tinción con hematoxilina-eosina (HE).**

#### **Preparación de las muestras.**

Una vez en el laboratorio, las muestras sumergidas en PBS se colocaron en un casete de hidratación para análisis histológico (Histosette I, Simport<sup>®</sup>), posteriormente se fijaron en formol al 10% para luego ser deshidratadas en concentraciones crecientes de alcohol, iniciando con etanol (J.T. Baker<sup>®</sup>) al 96% tres veces por 1 h cada una y después en etanol absoluto dos veces por 1 h cada una, continuando con la secuencia en etanol absoluto (50%) – xilol (50%) (Fermont<sup>®</sup>) por 1 h, seguido de xilol dos veces por 1 h cada uno y finalizando con parafina dos veces por 1 h cada una, este proceso fue realizado de manera automática en Histoquinete (TP1020, Leica<sup>®</sup>).

Una vez terminado el procesamiento del tejido, las muestras fueron incluidas en parafina (Paraplast<sup>®</sup>), para posteriormente obtenerse cortes en micrótopo (RM2125 RTS, Leica<sup>®</sup>) de 5 µm que se colocaron en laminillas (Deltalab<sup>®</sup>) previamente tratadas con Poli-L-Lisina (P8920, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), las cuales fueron desparafinadas en un horno a 60°C durante 20 min. Se continuó con la desparafinización y tinción del tejido colocando las laminillas en un rack que contenía xilol, concentraciones decrecientes de alcohol y colorantes.

El proceso de tinción HE fue el siguiente:

- |                             |          |
|-----------------------------|----------|
| - Xilol I entrada           | 10 min   |
| - Xilol II entrada          | 10 min   |
| - Xilol III entrada         | 10 min   |
| - Etanol I al 100% entrada  | 5 min    |
| - Etanol II al 100% entrada | 5 min    |
| - Etanol I al 95% entrada   | 3 min    |
| - Etanol II al 95% entrada  | 3 min    |
| - Etanol al 70% entrada     | 3 min    |
| - Etanol al 50% entrada     | 3 min    |
| - Agua                      | Enjuague |

- |                            |          |
|----------------------------|----------|
| - Hematoxilina             | 10 min   |
| - Agua                     | Enjuague |
| - Alcohol al 100%          | Enjuague |
| - Agua                     | Enjuague |
| - Eosina                   | 1 min    |
| - Etanol al 95% salida     | 3 min    |
| - Etanol I al 100% salida  | 3 min    |
| - Etanol II al 100% salida | 3 min    |
| - Xilol I salida           | 5 min    |
| - Xilol II salida          | 5 min    |
| - Xilol III salida         | 10 min   |

Finalmente, las laminillas ya teñidas fueron selladas con entellan (Merck®).

## **Anexo IV. Determinación de hormonas.**

### **A. Cuantificación de leptina**

#### ***A.1. Reactivos***

El estuche de para determinación de leptina consistió en los siguientes reactivos:

- A. *Amortiguador para Ensayo*: PBS 0.05 M de pH= 7.4, con EDTA 0.025 M, azida de sodio al 0.08%, BSA grado RIA al 1% y tritón X-100 al 0.05%.
- B. *Anticuerpo Específico para Leptina de Rata*. Suero de cobayo anti-leptina de rata mezclado con reactivo A.
- C. *Marca Radiactiva (Leptina-<sup>125</sup>I)*: Leptina de rata marcada con <sup>125</sup>I (<3 µCi) 111 kBq liofilizada para reconstituirse con el reactivo D.
- D. Amortiguador para marca radiactiva. Reactivo A mezclado con suero normal de cobayo.
- E. *Estándares de Leptina*: Leptina de rata recombinante disuelta en reactivo A a las siguientes concentraciones: 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 y 50 ng/mL
- F. *Controles de Calidad 1 y 2*: Leptina de rata recombinante a las concentraciones determinadas disueltas en reactivo A.
- G. *Reactivo Precipitante*: Suero de cabra anti-suero de cobayo, PEG al 3% y tritón X-100 al 0.05% en PBS 0.05 M, EDTA 0.025 M y azida de sodio al 0.08%.



## **A.2. Procedimiento**

La cuantificación por RIA se llevó a cabo de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, la determinación fue realizada durante tres días y el procedimiento se describe de manera breve a continuación.

*Día 1:* Se usaron tubos de ensayo de borosilicato de 12 × 75 mm y se depositó en cada uno de ellos 100 µL ya sea: de cada muestra sérica, de estándares (por duplicado), de controles de calidad o de amortiguador de ensayo (por triplicado) para la determinación de uniones totales, posteriormente a todos estos se agregaron 100 µL de anticuerpo anti-leptina y se mezcló con *vortex*. También ese mismo día en otros tubos se colocaron 300 y 200 µL de amortiguador de ensayo únicamente y por duplicado para la determinación de uniones inespecíficas y cuentas totales respectivamente. Todos los tubos se incubaron por 24 h a temperatura ambiente.

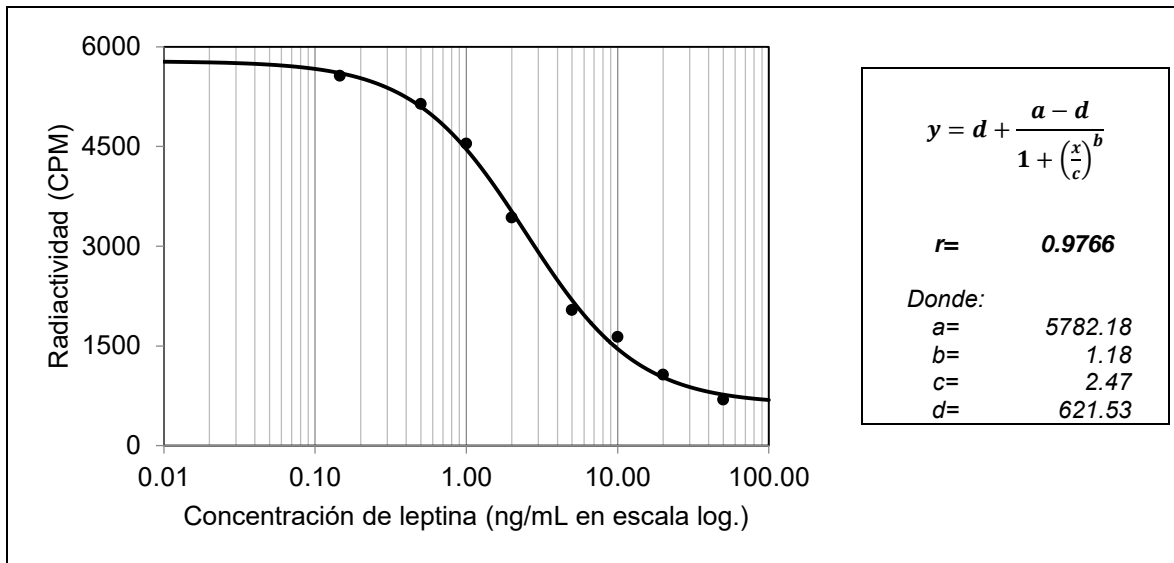
*Día 2:* A todos los tubos después de la incubación se les agregó 100 µL de la marca radiactiva reconstituida con el amortiguador para marca radiactiva. Todos los tubos se mezclaron con *vortex* y se incubaron nuevamente por 24 h a temperatura ambiente.

*Día 3:* Se agregó a todos los tubos después de la incubación el reactivo precipitante, se mezcló con *vortex* y se incubaron por 20 min a 4°C. Todos los tubos fueron centrifugados a 3000xg por 20 min a 4°C. El sobrenadante obtenido excepto el de los tubos correspondientes a las cuentas totales fue decantado cuidadosamente para así mantener únicamente el precipitado resultante en el tubo, el cual fue procesado en un contador de radiaciones y de Packard Instruments Company, programado para tener un tiempo de conteo de un minuto por cada muestra; asimismo, los datos fueron analizados automáticamente por el equipo para obtener la curva de calibración y a partir de esta calcular la concentración de cada muestra en ng/mL.

### A.3. Curva de calibración de leptina

El equipo determinó automáticamente una ecuación que relaciona la concentración de leptina (x) y la radiactividad emitida del precipitado (y) en forma de función logística de cuatro parámetros para la curva patrón (Figura A.1).

Ecuación A.1 Curva de Calibración de leptina



**Figura A.1. Curva de calibración para la determinación de leptina.** La línea continua corresponde a la función logística mostrada. Los datos de los estándares son mostrados con un punto. El eje de las abscisas se muestra en escala logarítmica.

## **B. Cuantificación de insulina**

### ***B.1. Reactivos***

El estuche de para determinación de insulina consistió en los siguientes reactivos:

- A. *Amortiguador para Ensayo*: PBS 0.05 M de pH= 7.4, con EDTA 0.025 M, azida de sodio al 0.08%, BSA grado RIA al 1%.
  
- B. *Anticuerpo Específico para Insulina de Rata*. Suero de cobayo antiinsulina de rata mezclado con reactivo A.
  
- C. *Marca Radiactiva (Insulina-<sup>125</sup>I)*: Insulina de rata marcada con <sup>125</sup>I (<5 µCi) 185 kBq liofilizada para reconstituirse con el reactivo D.
  
- D. *Amortiguador para marca radiactiva*. Reactivo A mezclado con IgG de cobayo como vehículo.
  
- E. *Estándares de Insulina*: Insulina de rata purificada en Amortiguador para estándar a las siguientes concentraciones: 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 y 10.0 ng/mL
  
- F. *Controles de Calidad 1 y 2*: Insulina de rata purificada disuelta en reactivo A a la concentración establecida.
  
- G. *Reactivo Precipitante*: Suero de cabra anti-suero de cobayo (IgG) PEG al 3% y tritón X-100 al 0.05% en PBS 0.05 M, EDTA 0.025 M y azida de sodio al 0.08%.

### ***B.2. Procedimiento***

La cuantificación por RIA se llevó a cabo de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, la determinación se llevó a cabo durante tres días y el procedimiento se describe de manera breve a continuación.

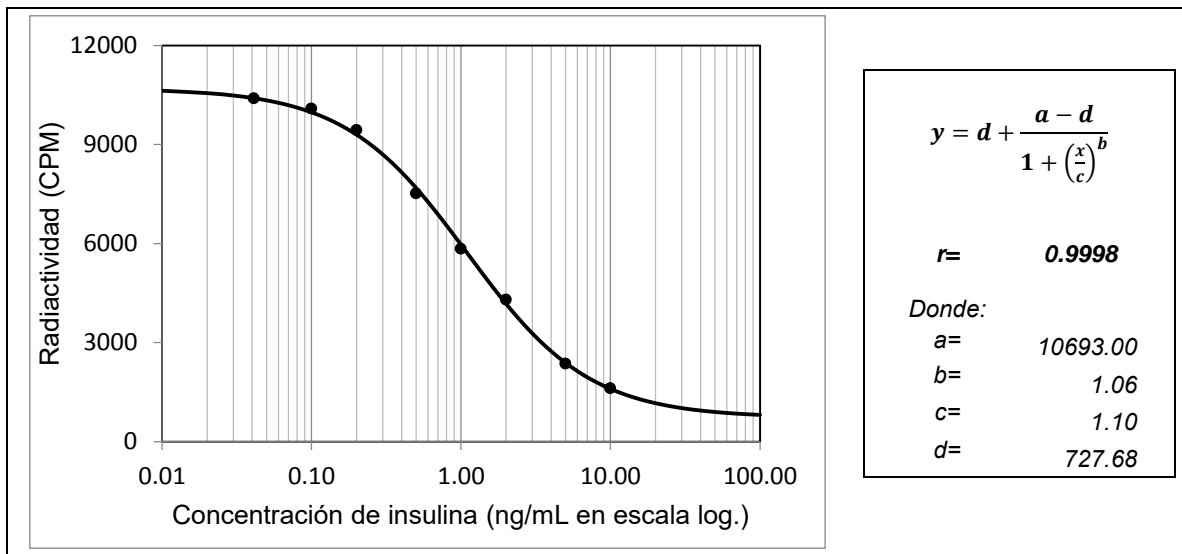
*Día 1:* Se usaron tubos de ensayo de borosilicato de 12 × 75 mm y se depositó en cada uno de ellos 100 µL ya sea: de cada muestra sérica, de estándares (por duplicado), de controles de calidad o de amortiguador de ensayo (por triplicado) para la determinación de uniones totales, posteriormente a todos estos se agregaron 100 µL de marca radiactiva (insulina-<sup>125</sup>I), y se mezcló con *vortex*. Posteriormente, de igual manera se agregó a todos los tubo 100 µL del anticuerpo específico para insulina. También ese mismo día en otros tubos se colocaron 200 y 100 µL de amortiguador de ensayo únicamente y por duplicado para la determinación de uniones inespecíficas y cuentas totales respectivamente. Todos los tubos se mezclaron con *vortex* y se incubaron por 24 h a 4°C.

*Día 2:* Se agregó a todos los tubos (excepto a los de cuentas totales) después de la incubación 1.0 mL del reactivo precipitante, se mezcló con *vortex* y se incubaron por 20 min a 4°C. Todos los tubos (excepto los de cuentas totales) fueron centrifugados a 3000×g por 20 min a 4°C. El sobrenadante obtenido excepto el de los tubos correspondientes a las cuentas totales fue decantado cuidadosamente para así mantener únicamente el precipitado resultante en el tubo, el cual fue procesado en un contador de radiaciones y de Packard Instruments Company, programado para tener un tiempo de conteo de un minuto por cada muestra; asimismo, los datos fueron analizados automáticamente por el equipo para obtener la curva de calibración y a partir de esta calcular la concentración de cada muestra en ng/mL.

### B.3. Curva de Calibración de insulina

El equipo determinó automáticamente una ecuación que relaciona la concentración de insulina (x) y la radiactividad emitida del precipitado (y) en forma de función logística de cuatro parámetros para la curva patrón (Figura B.1.).

Ecuación B.1 Curva de calibración de insulina



**Figura B.1. Curva de calibración para la determinación de insulina.** La línea continua corresponde a la función logística mostrada. Los datos de los estándares son mostrados con un punto. El eje de las abscisas se muestra en escala logarítmica.

# TRABAJOS RELACIONADOS

- a) Parte de este trabajo se presentó en: 5<sup>th</sup> International Symposium on Metabolic Programming and Stress & 2<sup>nd</sup> Meeting of Ibero-American DOHaD Chapter, celebrado en São Luis do Maranhão, Brasil, 2-4 de noviembre de 2016.

concentrations. **Results:** At 30 and 60 days of postoperative, CAF-SHAM group showed glucose intolerance and increased insulinemia during the test, compared to CON group. The RYGB normalized these parameters. As expected, cafeteria diet increased body weight, glycemia, and retroperitoneal and perigonadal fat pad accumulation (1,2; 1,2; 2,2 and 2,0, respectively) compared to CON. RYGB normalized body and fat pad weights, but did not alter the glycemia. Insulin secretion stimulated with 5.6 and 22.2 mM glucose was similar between groups. However, at 11.1 mM glucose, RYGB rats showed a 46% decrease in insulin secretion, compared

to CAF-SHAM group. CAF-SHAM male offspring presented glucose intolerance, and the RYGB, performed on fathers, seems to have a protective effect on male offspring glucose tolerance, at 30 days of life. **Conclusions:** The RYGB reduced the adiposity of obese fathers, decreased insulin secretion, stimulated by 11.1 mM glucose, and improved the glucose tolerance at 30 and 60 days of postoperative. Additionally, father's RYGB improved glucose tolerance in male offsprings. **Keywords:** Obesity, insulin secretion, bariatric surgery, epigenetic.

**Financial Support:** FAPESP and CAPES.

## SC06 - Maternal Obesity Leads to Negative Outcomes on Male Offspring Metabolism: Effects of Maternal Metformin Intervention.

GABRIELA LIRA-LEÓN<sup>1</sup>, CARLOS ALBERTO IBÁÑEZ-CHÁVEZ<sup>2</sup>, LUIS ANTONIO REYES-CASTRO<sup>3</sup>, ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México. E-mail: zamgon@yahooc.com.mx

**Background:** Maternal metabolic disturbances associated to obesity, such as impaired glucose metabolism play an important role in offspring developmental programming. Maternal interventions may contribute to prevent the adverse metabolic programming in the offspring. Metformin treatment improves glycemic control by increasing insulin sensitivity. We hypothesized that maternal metformin intervention prevents the negative metabolic outcomes in offspring from obese mothers. **Aim:** To evaluate the effects of metformin intervention in obese mothers prior to and throughout pregnancy on male offspring metabolism. **Methods:** Female wistar (F0) rats were weaned whether on a control diet (C= 4 kcal/g) or a high energy obesogenic diet (MO= 5 kcal/g) (C and MO groups). At PND 120, F0 rats were mated. Previously, half of each group received metformin orally, 300 mg/kg/day, from PND 90 until the end of pregnancy (CMet and MOMet groups). All male offspring (F1) were weaned on C diet and named according to their maternal group (n=8/group). At PND 110, F1 body weight (BW), Adiposity Index (AI= Total visceral fat

weight X 100/ body weight), serum leptin and triglycerides as well as Insulin Resistance Index (IRI) were determined. Fat cell size (FCS) was measured as cross sectional area in histological slides (H&E staining). Data were analyzed by 1-Way ANOVA ( $p < 0.05$ , Mean $\pm$ SEM). **Results:** In F1 at PND 110, despite of there were no differences in BW among groups, MO lead to increased AI (C=2.7 $\pm$ 0.2a, CMet=3.1 $\pm$ 0.3a, MO=3.6 $\pm$ 0.3b, MOMet=3.4 $\pm$ 0.1ab), FCS, serum leptin and triglycerides, as well as IRI (C=3.6 $\pm$ 0.5a, CMet=3.6 $\pm$ 0.6a, MO=6.1 $\pm$ 0.8b, MOMet=4.2 $\pm$ 1ab); however, maternal metformin intervention partially reduced all these variables, without any improvement in FCS. **Conclusion:** Metformin intervention in obese mothers before and during pregnancy, partially prevents male offspring negative metabolic outcomes by improving lipid and glucose metabolism.

**Key words:** Maternal obesity, metformin, adiposity, insulin, leptin.

**Financial Support:** G. Lira León received a scholarship as a Research Assistant from CONACyT, Mexico.

## SC07 - Intrauterine growth restriction persistently changes the degree of reward to the sweet food - study of dopaminergic pathway.

DANIELA PEREIRA LAUREANO<sup>1</sup>, MÁRCIO BONESSO ALVES<sup>1</sup>, PATRÍCIA MAIDANA MIGUEL<sup>1</sup>, TÂNIA DINIZ MACHADO<sup>1</sup>, ADOLFO RODRIGUES REIS<sup>2</sup>, AMANDA BRONDANI MUCCELLINI<sup>3</sup>, FÁBIO DA SILVA CUNHA<sup>4</sup>, ROBERTA DALLEMOLLE<sup>1</sup>, MINA DESAI<sup>4</sup>, MICHAEL G ROSS<sup>4</sup>, PATRÍCIA PELUFFO SILVEIRA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> PPG Neurociências UFRGS, Porto Alegre, Brazil.

<sup>2</sup> PPGSCA-HCPA-FAMED UFRGS, Porto Alegre, Brazil.

<sup>3</sup> PPG Psiquiatria-HCPA-FAMED UFRGS, Porto Alegre, Brazil.

<sup>4</sup> Dept of Ob/Gyn, Harbor-UCLA Med Ctr, Torrance, CA, United States.

**Background/Aims:** Intrauterine growth restriction (IUGR) is related to increased preference for palatable foods and enhanced adiposity. Central dopamine modulation by insulin can lead to changes in response to reward. We aimed at evaluating the release of dopamine during palatable food intake in animals submitted to an IUGR protocol. **Methods:** At gestation day 10, Sprague-Dawley dams started to receive *ad libitum* diet or 50% restricted diet (FR). At birth, pups were cross-fostered generating two groups (pregnancy/lactation): AdLib/AdLib (Controls) and FR/AdLib (IUGR). In adulthood, the dopamine release facing standard chow and palatable food was measured by chronoamperometry (a measurement in real time) recordings in NAcc, with or without previous systemic insulin treatment (5U/kg). **Results:** There was a delayed dopamine release in the IUGR group in response to Froot Loops® (time to reach the peak DA release (Control:599.8 $\pm$ 188; IUGR:1258 $\pm$ 194 sec,  $p=0.047$ ), but not in response to standard chow (Con-

trol:668 $\pm$ 317; IUGR:775 $\pm$ 246 sec,  $p=0.806$ ). Insulin treatment reverted the difference observed when Froot Loops® were available (Control:1093 $\pm$ 320; IUGR: 254 $\pm$ 127 sec,  $p=0.05$ ). Western blot analysis showed that SOCS3 was increased in the hypothalamus (OR\_%controls, Control:100.0 $\pm$ 39.68; IUGR:347.3 $\pm$ 82.72  $p=0.0168$ ) and decreased in the VTA of IUGR (OR\_%controls, Control:100 $\pm$ 7.41; IUGR:46.72 $\pm$ 11.78  $p=0.009$ ); pTH/TH was increased in the NAcc of IUGR as we have previously shown (ratio pTH/TH, Control:1.10 $\pm$ 0.10; IUGR:1.40 $\pm$ 0.06  $p=0.027$ ), but similarly to the chronoamperometry findings, this was reverted by insulin (ratio pTH/TH, Control: 1.07 $\pm$ 0.10; IUGR:0.95 $\pm$ 0.062  $p=0.338$ ). **Conclusion:** It was observed a delay in the dopamine release and metabolic alterations in response to palatable foods in the IUGR group when compared to the Control group. IUGR individuals might need to eat more sweet food to get the same level of pleasure, probably due to a delay in the dopamine release. These chan-

- b) Parte de este trabajo se presentó en: 64<sup>th</sup> Society for Reproductive Investigation Annual Scientific Meeting, celebrado en Orlando, Florida, Estados Unidos de América, 15-18 de marzo de 2017.

	GDM*	PH*	MAF*	CS*	P-value
Uterine/foetal -age	37.76 (2.42)	37.71 (2.47)	38.34 (3.86)	38.04 (2.74)	>0.05
(Mean (SD))					
BMD (kg/m <sup>2</sup> )	30.0 (3.01)	32.91 (6.07)	27.29 (3.26)	33.02 (7.17)	>0.05
(Mean (SD))					
Weight (kg)	78.15 (13.32)	88.40 (18.28)	74.30 (16.67)	89.54 (28.01)	>0.05
(Mean (SD))					
Hsp27 (ng/ml)	0.84 (0.14-1.43)	0.81 (0.56-1.29)	0.88 (0.52-1.27)	0.71 (0.37-1.23)	>0.05
(Median [Q1-Q3])					
Hsp70 (ng/ml)	0.07 (0.05-0.20) <sup>***</sup>	0.04 (0.02-0.08)	0.02 (0.00-0.07)	0.02 (0.01-0.04)	>0.05
(Median [Q1-Q3])					

**CONCLUSIONS:** In pregnancies complicated by GDM, neonatal Hsp70 is elevated and may serve as a sensitive marker for prenatal damage of fetal tissue.

**S-076**

**POMC, MC4R and HNF4A Methylation Are Associated with Metabolic Components in Obese Children.** Eun Jin Kwon,<sup>1</sup> Young Ah You,<sup>2</sup> Hae Seon Kim,<sup>2</sup> Eun Ae Park,<sup>1</sup> Su Jin Cho,<sup>2</sup> Young Ja Kim,<sup>1</sup> <sup>1</sup>Ewha Woman's University, Seoul, Korea; <sup>2</sup>Ewha Woman's University, Seoul, Korea; <sup>3</sup>Ewha Woman's University, Seoul, Korea.

**INTRODUCTION:** To investigate whether the associations between the DNA methylation of proopiomelanocortin (POMC), melanocortin 4 receptor (MC4R) and hepatocyte nuclear 4 alpha (HNF4A) genes and metabolic components in Korean children.

**METHODS:** We analyzed DNA methylation of metabolic-related genes in blood from 41 obese and 79 normal children collected between 7 and 9 years of age by pyrosequencing. Serum triglyceride (TG), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c), insulin and glucose levels were measured using an automatic analyzer. Analysis of covariance (ANCOVA) analyses was used to assess the association between the DNA methylation status and metabolic indices.

**RESULTS:** In obese children, TG and insulin levels were increased, and HDL-c levels were decreased than normal-weight children ( $P < 0.01$ ). Moreover, the methylation status of *HNF4A* were significantly higher in obese compared to normal-weight children. We found a significant correlation between methylation status of *POMC* and *MC4R* and HDL-c levels, between methylation status of *MC4R* and *HNF4A* and TC and insulin levels. TG levels was marginally significant associated with methylation status of *MC4R* ( $P = 0.09$ ). TC levels were associated with methylation status of *POMC* and *HNF4A* ( $P = 0.05$ , respectively). In addition, HDL-c levels were related to methylation status of *POMC* and *HNF4A* ( $P = 0.07$ , respectively). In carbohydrate metabolism, insulin levels were related to methylation status of *MC4R* and *HNF4A* ( $P < 0.05$ , respectively).

**CONCLUSIONS:** These results suggest that *POMC*, *MC4R* and *HNF4A* methylation have a body mass index-independent association with metabolic indices in children. These findings provide evidence for identifying epigenetic modifications of altered metabolic indices and may be useful for risk assessment.

**S-077**

**Impaired Ischemia Reperfusion Responses in Adult Male and Female Hearts of Offspring (F1) of Obese Rats.** Carlos Ibáñez,<sup>1</sup> Francisco Correa,<sup>2</sup> Gabriela Lim-Luán,<sup>1</sup> Luis A Reyes-Castro,<sup>1</sup> Francisco J Roldán,<sup>3</sup> Alejandro Silva-Palacios,<sup>2</sup> Mabel Baéza,<sup>2</sup> Cecilia Zazueta,<sup>2</sup> Peter W Nathaniel,<sup>4</sup> Elena Zambrano\*<sup>1</sup> <sup>1</sup>Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición SZ, Mexico City, Mexico; <sup>2</sup>Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico; <sup>3</sup>University of Wyoming, Laramie, WY, USA; <sup>4</sup>Texas Biomedical Research Institute, San Antonio, TX, USA.

**INTRODUCTION:** Maternal obesity (MO) predisposes F1 to cardiovascular disease (CD) that can be studied by ultrasound and the isolated heart.

**METHODS:** Female (FD) Wistar rats ate chow (C) or obesogenic diet (MO) from weaning through pregnancy and lactation. Non-ult male (M; n=5) and female (F; n=8, MO n=7) F1 were weaned to chow. At postnatal day (PND) 550, basal echo function was determined. 2 d later hearts underwent 20 min *in vitro* global ischemia with 30 min reperfusion. Fat deposits dissected and total adipose tissue/body weight calculated. Insulin and glucose were measured.

**RESULTS:** Echocardiogram at rest was normal. Relative heart weight (M C=3.3±0.6, MO=4.2±0.6\*; F C=3.3±0.5, MO=3.4±0.05, g/kg p=0.05), adiposity index and thoracic fat were higher in M MO F1 than C, F MO and C were similar. C M hearts recovered 78% function and C F 83% after 30 min reperfusion but MO M hearts only 28% and MO F hearts 52% of function, respectively. Heart rates (HR) were similar between genders during reperfusion. Fig 1.

\*Figures will be available online.

**Fig. 1:** Left ventricular pressure (LVP) in F1 male (a) and female (b); HR F1 male (c) and female (d). M ± SEM t-test, n=5-8. C (circles), MO (triangles); \* MO vs C, p < 0.05.

**CONCLUSIONS:** There were no observable differences in echo evaluation at rest. Following the challenge of ischemia-reperfusion, MO hearts showed higher susceptibility to reperfusion damage in both sexes. The increased thoracic fat may play a local role. In addition, blood parameters indicated generalized insulin resistance (data not shown) which impairs cardiac function.

**S-078**

**Antenatal Glucocorticoids Exposure Induces Left Ventricular Hypertrophy in the Adult Offspring in Sheep.** Won-Joon Seong, Angela G Massmann, Jie Zhang, Jorge P Figueroa\*, Wake Forest School of Medicine, Winston-Salem, NC, USA.

**INTRODUCTION:** Exposure to glucocorticoids (GC) in the perinatal period is associated with several cardiometabolic alterations. We and others have shown elevations in blood pressure and increased vascular reactivity. The aim of the present study was to determine if the relatively minor elevation in blood pressure we observe can induce end organ damage.

**METHODS:** Pregnant sheep were treated with two IM doses of betamethasone (Beta, 0.17 mg/kg) or vehicle (V) 24-h apart at 80 days gestation and allowed to deliver at term. We harvested heart tissue from 18 mo sheep of both sexes treated with either vehicle (V; 8 females, 10 males) or Beta (9 females, 13 males). A slice of the heart cut across the ventricles at the junction of the upper 1/3 with the bottom 2/3 of the anterior aspect of the ventricular mass was obtained. High definition pictures were taken and Left (L) and right (R) ventricular and septal (S) thickness were obtained and analyzed with SigmaScan Pro. Data are expressed as Mean±SEM and were analyzed by ANOVA and two sample t test.

**RESULTS:** Although there was a trend for higher body weight in males, no significant differences were observed when analyzed by sex or treatment. We found a significant increase in left ventricular thickness in both males and females. L:S: L to S thickness ratio; R:S R to S ratio; L:R L to R ratio. The increase in wall thickness was restricted to the left ventricle. When ventricular thickness was normalized by septal thickness the significant Beta effect was still present. (\*p<0.05 vs V).

\*Figures will be available online.

**CONCLUSIONS:** Our data show that prenatal exposure to a single course of GC at 0.55 gestation has long-term effects on ventricular

Saturday Posters