



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

IMPACTO DE LA OBESIDAD MATERNA DE LA RATA SOBRE EL CRECIMIENTO DEL
TEJIDO ADIPOSO DE LOS DESCENDIENTES

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. EN C. CARLOS ALBERTO IBÁÑEZ CHÁVEZ

TUTOR PRINCIPAL

DRA. ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. MARTA ALICIA MENJÍVAR IRAHETA

Facultad de Química

DR. FERNANDO LARREA GALLO

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Ciudad Universitaria CD. MX. Septiembre, 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

PMDCB/2749/2018

Ibáñez Chávez Carlos Alberto
Estudiante de Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día **12 de noviembre** del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **DOCTORADO EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis **“Impacto de la obesidad materna de la rata sobre el crecimiento del tejido adiposo de los descendientes”**, dirigida por el/la Dr(a). **Zambrano González Elena**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Canizales Quinteros Samuel
VOCAL	Estrada Gutierrez Guadalupe
VOCAL	Tovar Palacio Armando Roberto
VOCAL	Díaz Villaseñor Andrea Sachi
SECRETARIO	Cerbón Cervantes Marco Antonio

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
“POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 13 de noviembre de 2018.
COORDINADORA



Dra. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ

Agradecimientos

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la
Universidad Nacional Autónoma de México

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca 262656, otorgada para
la realización de mis estudios de doctorado

A la Dra. Elena Zambrano González, tutora principal, así como a la Dra. Marta
Alicia Menjívar Iraheta y al Dr. Fernando Larrea Gallo, miembros del comité
tutor, por sus valiosas aportaciones a este trabajo.

El presente trabajo fue realizado como parte del proyecto
RCUK-CONACyT I000/726/2016 FONCICYT/49/2016

Dedicatoria:

A Dios

A mis padres María Elena Chávez y Rafael Ibáñez,

A mis hermanos Ana María Ibáñez y José Rafael Ibáñez

A mi novia Analilia Saldívar

Agradecimientos

A mi tutora, la Dra. Elena Zambrano González por todo el apoyo otorgado y por mi formación académica.

Al Dr. Peter W. Nathanielsz por el impulso que ha dado a mi formación académica.

A la Dra. Guadalupe L. Rodríguez González, Dr. Luis A. Reyes Castro, Dra. Claudia J. Bautista Carbajal, Dra. Consuelo Lomas Soria y a la Dra. Diana Catalina Castro, por contribuir a mi formación académica.

A la QFB. Alejandra Hernández Rojas, QA. Gabriela Lira León, PTBQ. Gimena Juárez Pílares, QFB. Jorge Uribe Cleofas, por su ayuda incondicional en laboratorio y los momentos compartidos.

A la Dra. Lilia Vargas Hernández, Dra. Erika Chavira Suarez, Dr. Sergio de los Santos, M. en C. Emma Marcela Centurión Murillo, quienes de alguna manera han alentado mi formación

Al Departamento de Investigación Experimental y Bioterio a Cargo de la MVZ. Mariela Contreras Escamilla, por todas las facilidades otorgadas para el desarrollo de los experimentos con animales de esta tesis.

A la Dra. Guadalupe Estrada Gutiérrez y los miembros de su equipo de trabajo, Dr. Mario Solís Paredes y Dra. Eyerahí Bravo Flores, por las facilidades otorgadas para realizar los análisis moleculares del tejido adiposo en el Instituto Nacional de Perinatología.

A mis compañeras en el Depto. de Biología de la Reproducción, M. en C Ana Laura Ortega Márquez, QFB. Nancy María V. Sánchez Lira y Dra. Tonantzin Sosa Larios por todas las atenciones recibidas y sobre todo por su amistad.

Al Programa latinoamericano para la investigación en salud sexual y reproductiva, por la beca que me permitió realizar una estancia de entrenamiento en el Laboratorio de Investigación en Biología Celular de la Secreción (LBCS) de la Universidade Estadual de Marigá (UEM) en Paraná, Brasil.

Al Dr. Paulo Cezar de Freitas Mathias, quien encabeza el LBCS y a la Dra. Kesia Palma Rigo por el entrenamiento y todas las facilidades otorgadas durante mi estancia en Brasil.

A los colaboradores del LBCS, Dra. Laize Perón Tofolo, Dra Ananda Malta, Dr. Andrei Pavanello, Dr, Rodrigo Mello Gomes, Dr. Flavio Andrade, Dra. Veridiana Moreira, Dr. Vander Alves, así como a la Nut. Camila Conejo Coraza, por sus atenciones y ayuda durante mi estancia en Brasil.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ANTECEDENTES	3
ORÍGENES EN EL DESARROLLO DE LA SALUD Y LA ENFERMEDAD	3
CARACTERÍSTICAS DE LA PROGRAMACIÓN DEL DESARROLLO.....	5
OBESIDAD MATERNA EN EL CONTEXTO DEL CONCEPTO DOHaD	8
TEJIDO ADIPOSO DE LOS DESCENDIENTES DE MADRES OBESAS.....	11
JUSTIFICACIÓN	20
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
HIPOTÉISIS	23
OBJETIVOS	24
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS PARTICULARES.....	24
MÉTODOS	25
MODELO BIOLÓGICO	25
METABOLISMO DE LAS HEMBRAS EXPERIMENTALES F0	33
METABOLISMO DE LOS DESCENDIENTES F1	33
COMPOSICIÓN CORPORAL DE LOS DESCENDIENTES F1	34
TEJIDO ADIPOSO DE LOS DESCENDIENTES F1	35
EXPRESIÓN GÉNICA EN EL TEJIDO ADIPOSO DE LOS DESCENDIENTES F1	40
ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN ESTROMAL VASCULAR DE LOS DESCENDIENTES F1 ..	43
RESULTADOS.....	46
METABOLISMO DE LAS HEMBRAS EXPERIMENTALES F0	46
METABOLISMO DE LOS DESCENDIENTES F1	49
COMPOSICION CORPORAL DE LOS DESCENDIENTES F1	53
TEJIDO ADIPOSO DE LOS DESCENDIENTES F1	55

EXPRESIÓN GÉNICA EN LA FRACCIÓN ESTROMAL VASCULAR DE LOS DESCENDIENTES F1	61
DISCUSIÓN	63
EFFECTOS INTERGENERACIONALES DE LA OBESIDAD MATERNA.....	63
DESCENDIENTES F1 DE MADRES OBESAS	70
CONCLUSIONES	81
PERSPECTIVAS.....	83
REFERENCIAS	84
ANEXOS	91
1. PUBLICACIONES DERIVADAS DEL PROYECTO DE TESIS.....	91
Different statistical approaches to characterization of adipocyte size in offspring of obese rats: effects of maternal or offspring exercise intervention.....	92
A high fat diet during adolescence in male rats negatively programs reproductive and metabolic function which is partially ameliorated by exercise.....	105
2. OTRAS PUBLICACIONES DESARROLLADAS DURANTE EL DOCTORADO	116
Maternal Obesity: Lifelong Metabolic Outcomes for Offspring from Poor Developmental Trajectories During the Perinatal Period.....	117
Accelerated aging of reproductive capacity in male rat offspring of protein-restricted mothers is associated with increased testicular and sperm oxidative stress (Resumen)	129
Adult exercise effects on oxidative stress and reproductive programming in male offspring of obese rats (Resumen)	130
Macrophage Populations in Visceral Adipose Tissue from Pregnant Women: Potential Role of Obesity in Maternal Inflammation (Resumen)	131
Maternal obesity has sex-dependent effects on insulin, glucose and lipid metabolism and the liver transcriptome in young adult rat offspring (Resumen).....	133
El perfil de expresión de genes adipogénicos en ratas macho descendientes de madres obesas está relacionado a la patogénesis de la resistencia a la insulina (Cartel).....	135

FIGURAS

Figura 1. Efectos de la programación del desarrollo.	7
Figura 2. Mecanismos de expansión del tejido adiposo.	17
Figura 3. Distribución de tamaños del adipocito y su diferenciación terminal.....	18
Figura 4. Morfología del tejido adiposo.....	19
Figura 5. Diseño experimental.....	27
Figura 6. Diagrama de Poisson-Voronoi.....	37
Figura 7. Análisis de la distribución del tamaño del adipocito	39
Figura 8. Curva de crecimiento materno antes de aparear.	46
Figura 9. Peso corporal materno durante la gestación y lactancia	47
Figura 10. Metabolismo materno de glucosa al final de la lactancia.	48
Figura 11. Metabolismo materno de lípidos al final de la lactancia.	48
Figura 12. Peso corporal e ingesta de alimento de los descendientes.....	50
Figura 13. Metabolismo de lípidos en los descendientes F1.....	51
Figura 14. Metabolismo de glucosa en los descendientes F1.....	52
Figura 15. Adiposidad de los descendientes.	53
Figura 16. Análisis de la composición corporal por DXA en F1.....	54
Figura 17. Tejido adiposo retroperitoneal de las crías F1.....	55
Figura 18. Caracterización del tamaño del adipocito en las crías F1.	56
Figura 19. Distribución de tamaño del adipocito en F1.....	57
Figura 20. Expresión génica en el tejido adiposo en machos y hembras F1.....	58
Figura 21. Asociación de genes diferencialmente expresados en hembras F1.....	60
Figura 22. Adipogénesis en la Fracción Estromal Vascular de los machos F1.	61
Figura 23. Adipogénesis en la Fracción Estromal Vascular de hembras F1.	62

TABLAS

Tabla 1. Composición nutricional de las dietas	28
Tabla 2. Distribución corporal del tejido adiposo.....	29
Tabla 3. Genes asociados a la expansión del tejido adiposo.....	40
Tabla 4. Peso corporal al nacimiento y al final de la lactancia de F1	49
Tabla 5. Proporción de adipocitos grandes y pequeños en F1.....	58
Tabla 6. Expresión génica y su asociación funcional en los machos OM F1	59
Tabla 7. Expresión génica y su asociación funcional en las hembras OM F1	59

ECUACIONES

Ecuación 1. Índice de Adiposidad	29
Ecuación 2. Índice de resistencia a la insulina	32
Ecuación 3. Ingesta de alimento por día	34
Ecuación 4. Función de densidad de probabilidad gamma	38
Ecuación 5. Función gamma	38
Ecuación 6. Estimador del parámetro de forma	39
Ecuación 7. Estimador del parámetro de escala	39

RESUMEN

Diversos estudios epidemiológicos sugieren que los hijos de madres obesas son propensos a acumular grasa corporal en exceso y desarrollar enfermedades metabólicas. Los modelos con animales experimentales han confirmado que las crías de madres obesas exhiben mayor adiposidad, resistencia a la insulina (RI), dislipidemia y secreción anormal de adipocinas de una manera específica respecto al sexo, lo que podría estar relacionado con la hipertrofia del tejido adiposo. Sin embargo, las alteraciones en el mecanismo de expansión del tejido adiposo que promueven la hipertrofia y que son programadas por la obesidad materna no son bien conocidas. Por lo tanto, el propósito de este trabajo fue elucidar el mecanismo de expansión del tejido adiposo que promueve la hipertrofia y en consecuencia la disfunción metabólica en machos y hembras descendientes de madres obesas. Para esto, ratas hembra de la cepa Wistar (F0), fueron destetadas ya sea con dieta control (C = 4 Kcal / g) o dieta alta en grasa (OM = 5 Kcal / g) a los 21 días de edad (d) y se aparearon con machos no experimentales a los 120 d. Las crías descendientes (F1) de los grupos (C y OM, n = 8 camadas /grupo) se destetaron con dieta C en el día postnatal (DPN) 21. Un macho y una hembra F1 de diferente camada fueron eutanizados a los 110 DPN para llevar a cabo el muestreo sanguíneo y disección del Tejido Adiposo (TA); se determinó la concentración sanguínea de glucosa, triglicéridos y leptina; las proporciones de adipocitos grandes y pequeños se analizaron en cortes de TA retroperitoneal mediante el modelaje con la distribución gamma. Así mismo, se evaluó la expresión de 84 genes asociados a la expansión del TA mediante un arreglo de RT-PCR. Así mismo se determinó la expresión de genes maestros de la adipogénesis PPAR- γ y CEBP- α en la Fracción Estromal Vascular (FEV) del TA por su alto contenido de precursores del adipocito. A pesar que tanto el peso corporal como la ingesta de alimento fueron similares en los grupos F1, machos y hembras OM mostraron mayor masa de grasa visceral en la disección. Se observó mayor RI e hipertrigliceridemia en machos y hembras OM e hiperleptinemia en los machos OM pero no en hembras. Los F1 OM tuvieron mayor tamaño de adipocito, con menor proporción de adipocitos pequeños (en machos: C = 10%, OM = 0.1% y hembras; C = 10%, OM = 0.4%), y mayor proporción de adipocitos grandes (en machos: C = 10%, OM = 69% y mujeres: C = 10%, OM = 39%). El perfil de expresión de F1 OM, en los machos OM mostró 53 genes regulados a la baja, los cuales fueron asociados a vías proliferativas (WNT, ciclo celular y activación de receptores nucleares), en las hembras OM 15 genes regulados a la alta, los cuales fueron asociados a la acumulación de grasa (por la vía de la MAPK). En la FEV de F1 OM, se observó mayor expresión de PPAR- γ (asociado a la fase de compromiso de los preadipocitos). Sin embargo, en el grupo OM la expresión de CEBP- α (relacionada con la ganancia de funciones), se redujo en los machos y aumentó en las hembras. En conclusión, en F1 OM la acumulación excesiva de TA, en los machos se puede explicar principalmente por alteraciones en la diferenciación terminal del adipocito, que origina adipocitos disfuncionales y en las hembras principalmente por alteraciones que promueven mayor acumulación de grasa en el adipocito.

ABSTRACT

Several epidemiological studies suggest that obese mother's offspring are prone to accumulate excessive body fat and metabolic disease. Experimental animal models have confirmed that obese mothers' offspring exhibit greater adiposity with insulin resistance (IR), dyslipidemia and altered adipokine secretion in a sex-specific manner, which might be related to adipose hypertrophy. However, alterations leading to increased adipose tissue expansion programmed by maternal obesity are not well understood. Therefore, this work aimed to elucidate the adipose tissue mechanism of expansion that promotes the hypertrophy, leading to metabolic dysfunction in male and female obese mother's offspring. For this, female Wistar rats (F0) were weaned either onto a control (C = 4 Kcal/g) or high fat (OM = 5 Kcal/g) diet at 21 days of age (d) and mated with non-experimental males at 120 d. Offspring (F1) of both groups (C and OM, n=8 litters/group) were weaned at postnatal day (PND) 21 onto C diet. One male and female F1 from different litter were euthanized at PND 110 for blood sampling and Adipose Tissue (AT) dissection; blood glucose, triglycerides, insulin and leptin levels were determined; large and small adipocyte proportions were analyzed in retroperitoneal AT histological sections by gamma distribution modelling. As well, expression of 84 genes related to AT expansion were evaluated through RT-PCR array and the expression adipogenesis master regulator genes PPAR- γ and CEBP- α were determined in the Stromal Vascular Fraction (SVF) of AT due to its high content of adipocyte precursors. Despite of similar F1 body weight and food intake, OM males and females showed greater visceral fat mass at dissection. IR and hypertriglyceridemia were observed in OM male and female F1 and hiperleptinemia in OM males but not in females. OM F1 groups had greater adipocyte size, with decreased proportion of small adipocytes (in males: C=10%, OM=0.1% and females; C=10%, OM= 0.4%), and increased proportion of large adipocytes (in males: C= 10%, OM = 69% and females: C=10%, OM=39%). The OM F1 expression profile in males showed 53 down-regulated genes associated to proliferative pathways (WNT, cell cycle and nuclear receptor activation) and in OM females 15 up-regulated genes associated to fat accumulation (by AMPK pathway). In F1 SVF, an increased expression of PPAR- γ (related to preadipocyte commitment) was observed in OM groups. However, CEBP- α (related to gaining of function) was reduced in OM males and increased in OM females. In conclusion, the F1 OM AT accumulation, in males can be explained to a large extent by alteration in terminal adipocyte differentiation, which originates dysfunctional adipocytes and in females, largely due to alterations leading to increased fat accumulation into adipocyte.

ANTECEDENTES

ORÍGENES EN EL DESARROLLO DE LA SALUD Y LA ENFERMEDAD

En los últimos 50 años, múltiples estudios epidemiológicos han demostrado que existe una asociación estrecha entre diversas condiciones ambientales desfavorables durante el desarrollo fetal y neonatal, con una mayor predisposición a enfermedades en la vida adulta (Gluckman, Buklijas, & Hanson, 2016). Sin embargo, fue hasta los años 80 que los estudios epidemiológicos de David Baker permitieron establecer la hipótesis de la programación del desarrollo, la cual postula que diversos estímulos ambientales durante períodos críticos del desarrollo como la gestación y la lactancia pueden tener efectos fisiológicos adversos a largo plazo (D. J. Barker, 1995; D. J. P. Barker, 1998). Se ha descrito a esos efectos como consecuencias cardíacas, metabólicas (D. J. Barker, 2007; D. J. Barker & Osmond, 1986), endócrinas (Gore, 2015), en la función reproductiva (Ho et al., 2017) e incluso a nivel conductual (Van Den Bergh, 2011).

Actualmente, los postulados de la hipótesis de la programación del desarrollo se han entendido como un proceso fisiológico, donde un mismo genotipo es capaz de dar origen a múltiples rasgos fenotípicos permanentes, en respuesta a diversos factores ambientales. La hipótesis de la programación del desarrollo ha evolucionado (Wadhwa, Buss, Entringer, & Swanson, 2009) hasta convertirse en el concepto de los orígenes en el desarrollo de la salud y la enfermedad (DOHaD por sus siglas en inglés), en el cual se concibe que la respuesta de un organismo a un reto ambiental específico durante una ventana crítica del desarrollo es capaz de alterar la trayectoria del desarrollo de un organismo. En consecuencia, una alteración en este proceso, resultará en efectos en la salud que persisten a lo largo de la vida (E. Zambrano & Nathanielsz, 2013).

Dentro del concepto DOHaD, se denominan ventanas críticas del desarrollo a las etapas de la vida en donde es más probable que los organismos expresen modificaciones fenotípicas en respuesta a determinados factores ambientales (Burggren & Mueller, 2015). Así mismo, es ampliamente aceptado que las ventanas críticas del desarrollo más importantes son la embriogénesis, la vida fetal y neonatal, (Rosenfeld, 2016). Sin embargo, se ha descrito que desde la formación de gametos, la fecundación, el desarrollo embrionario y fetal, así como durante las etapas correspondientes a la infancia y la adolescencia, los organismos poseen una gran plasticidad fenotípica en comparación con etapas posteriores (Bateson et al., 2004). Es decir, muestran una alta capacidad de respuesta ante estímulos específicos, como la alta o baja disponibilidad de nutrientes, baja concentración de oxígeno, niveles hormonales inadecuados y exposición a contaminantes, entre otros (Heerwagen, Miller, Barbour, & Friedman, 2010).

Debido a que el desarrollo de los tejidos ocurre en diversos periodos específicos del ciclo de vida de un organismo, las ventanas críticas de programación también serán específicas para cada uno de ellos. En el caso de los roedores, algunos órganos y sistemas se encuentran plenamente desarrollados antes del nacimiento, mientras que otros como el cerebro, el sistema inmunológico y los mecanismos de control metabólico se continuarán desarrollando durante la infancia (Heindel & Vandenberg, 2015). Además, existen procesos en el desarrollo temprano que contribuyen al incremento en la susceptibilidad de un organismo para ser programado por estímulos ambientales específicos. Por ejemplo, durante la embriogénesis, la formación del organismo depende de la proliferación y maduración de células pluripotenciales, las cuales tienen la capacidad de diferenciarse en cualquier tipo de célula. Por lo tanto, es necesario el control riguroso de la proliferación y maduración de las células embrionarias, el cual es ejercido por medio de hormonas y otras moléculas de señalización (Boklage, 2012). En consecuencia, si hay perturbación de los mecanismos de señalización que regulan la proliferación y/o diferenciación de las células embrionarias, el desarrollo de diversos órganos y tejidos puede ser modificado.

Debido a que los sistemas centrales de la regulación endócrina son establecidos durante la gestación, si ocurren perturbaciones que interfieran con la señalización hormonal, es posible que estos sistemas no se establezcan de forma adecuada, lo que también puede contribuir al desarrollo de efectos fisiológicos adversos en la vida posnatal (P. D. Taylor & Poston, 2007). Por ejemplo, se sabe que durante el desarrollo embrionario y fetal de los mamíferos se establece el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, el cual constituye un mecanismo de control hormonal que participa en diversas funciones fisiológicas, como la respuesta al estrés, la digestión, la respuesta inmune, la conducta sexual y el metabolismo energético. Se considera que este mecanismo de control endócrino es vulnerable durante la gestación y la lactancia (Montenegro, Nascimento, Assis, & Santos-Lopes, 2019).

CARACTERÍSTICAS DE LA PROGRAMACIÓN DEL DESARROLLO

Los estudios llevados a cabo bajo el enfoque del concepto DOHaD confirman que los cambios programados durante etapas críticas del desarrollo se manifiestan a largo plazo,. Incluso, es común observar diversos rasgos fenotípicos que solo se hacen evidentes en periodos posteriores al insulto ambiental que los originó. Los cambios fenotípicos programados que se manifiestan a largo plazo podrían explicarse, al menos en parte, por mecanismos epigenéticos (Heerwagen et al., 2010), en los cuales ocurren modificaciones covalentes en el DNA que no alteran la secuencia de nucleótidos, pero establecen marcas que codifican la manera y el momento en que será expresado el genoma. Estas marcas, que en conjunto se denominan epigenoma, puede ser transmitido de una célula a otra durante la división celular (Nicholson, Veland, & Chen, 2015).

Debido al carácter dinámico del epigenoma, éste se expresa de manera relativamente invariable una vez que los tejidos son formados, de tal manera que las modificaciones epigenéticas originadas en el desarrollo temprano pueden ser mantenidas mediante circuitos de retroalimentación positiva y negativa, dando lugar a cambios estables en la expresión de genes metabólicos y los genes reguladores de su transcripción (Heerwagen et al., 2010).

En el presente trabajo, se abordan únicamente efectos de tipo intergeneracional, en los que el estado metabólico materno (F0) tiene un efecto importante en la vida posnatal de los descendientes (F1). Estos efectos, se denominan de tipo intergeneracional (Anway, Cupp, Uzumcu, & Skinner, 2005), porque aunque la exposición ambiental ocurra sobre la generación materna (F0), el estado metabólico de la madre durante fases pre gestacionales impactará en las células germinales que darán origen a F1 y en las etapas correspondientes a la gestación y lactancia, impactará directamente sobre F1.

Es importante señalar que los efectos fisiológicos programados que pueden ser heredados a lo largo de diferentes generaciones, tanto por vía materna como por vía paterna, también son objeto de estudio en el contexto del concepto DOHaD. Dicha transmisión fenotípica, incluye componentes que son heredados por mecanismos que no implican cambios en la secuencia de nucleótidos de los genes transmitidos de padres a hijos (Heerwagen et al., 2010) manteniendo los efectos transgeneracionales, los cuales pueden manifestarse como alteraciones de procesos biológicos asociados al desarrollo como la expresión génica y propensión a enfermedades.

Dentro del contexto DOHaD del concepto, se denominan efectos transgeneracionales a los cambios fenotípicos que permanecen en la vida posnatal a partir de los descendientes F2 si los sujetos F0 que fueron expuestos al estímulo programador fueron machos; y a partir de los descendientes F3 si los sujetos F0 que fueron expuestos al estímulo programador fueron hembras (Ambeskovic, Roseboom, & Metz, 2017). Cabe aclarar que se hace esta distinción debido a que

las células germinales que dan origen a la generación F2, se encuentran presentes desde el desarrollo embrionario de las hembras F1 (Fig. 1). Por lo tanto, los efectos fenotípicos heredados de forma transgeneracional solo se pueden explicar por la transmisión de marcas epigenéticas originadas por la exposición de la células germinales a diversos estímulos programadores (Ambeskovic et al., 2017).

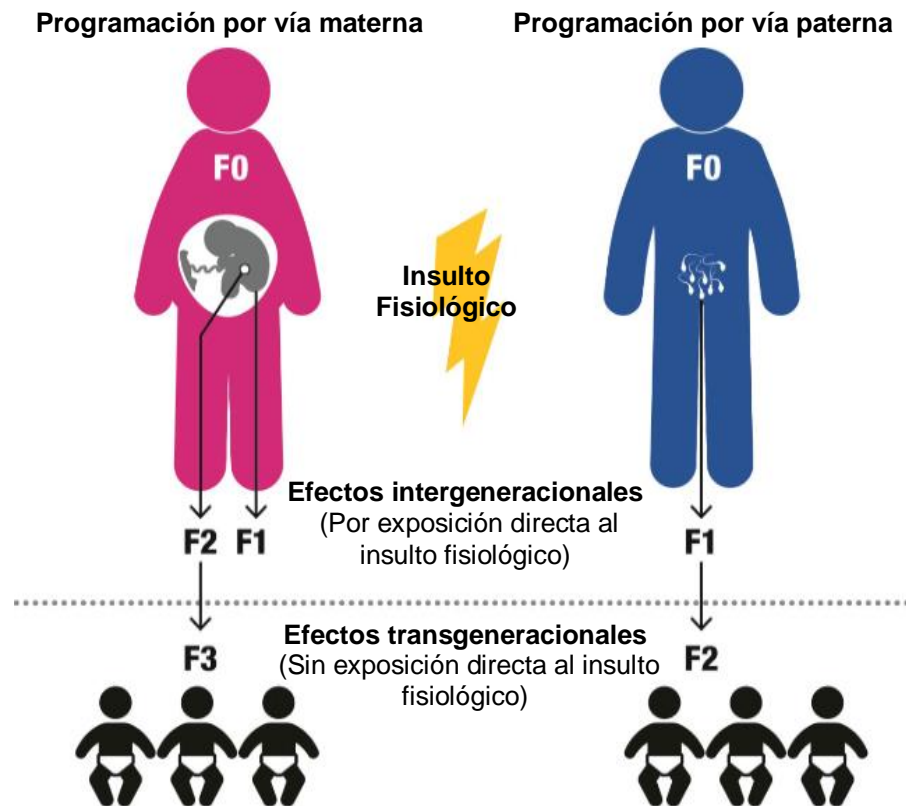


Figura 1. Efectos de la programación del desarrollo. Las alteraciones programadas por vía materna en los descendientes F1 y F2 y por vía paterna en los descendientes F1 son considerados como efectos intergeneracionales por que al menos las líneas germinales de los descendientes han tenido exposición directa al insulto fisiológico que los originó.

Es ampliamente aceptado que la programación del desarrollo ocurre de manera específica dependiendo del sexo. De hecho, cada vez hay más evidencia de que diversos efectos fisiológicos son programados de manera diferente en machos y hembras, aun cuando éstos hayan ocurrido en respuesta a un mismo reto en la misma ventana de desarrollo (Junien, Fneich, Panchenko, Voisin, & Gabory, 2015).

Existen diversas posibilidades para explicar estas diferencias, una de ellas podría deberse a la diferencia que existe entre hembras y machos en la temporalidad del desarrollo de diversos órganos y sistemas. Quizás el ejemplo más claro de las diferencias en el desarrollo de los organismos asociadas al sexo, sea el desarrollo de los sistemas reproductivos, que incluyen la formación de gametos. Las ventanas críticas de programación para las células germinales son distintas entre hembras y machos, debido a que las células germinales que dan origen a los óvulos entran en meiosis desde etapas prenatales y completan las fases iniciales de este proceso antes del nacimiento; mientras que las células germinales que dan origen a los espermatozoides, sólo lo hacen después del nacimiento (Ho et al., 2017). Por lo tanto, las ventanas críticas de programación para las células germinales serán distintas entre hembras y machos. Sin embargo, no se han determinado los mecanismos moleculares que originan los cambios fisiológicos específicos de cada sexo, así como en otros órganos y sistemas compartidos por ambos sexos. Tampoco se ha establecido, la manera en que estos cambios, posteriormente son mantenidos, borrados o incluso como es que dan origen a nuevos cambios (Junien et al., 2015)

OBESIDAD MATERNA EN EL CONTEXTO DEL CONCEPTO DOHaD

Estudios epidemiológicos y con modelos animales indican que la obesidad materna impacta de manera adversa tanto en la salud de la madre como en el fenotipo de sus descendientes, predisponiéndolos a enfermedades crónicas degenerativas en la vida posnatal que incluyen obesidad, dislipidemias, diabetes mellitus tipo 2 e hipertensión (E. Zambrano, Ibáñez, et al., 2016).

La mayor parte de estudios epidemiológicos que analizan las consecuencias de la obesidad materna desde el enfoque del concepto DOHaD, se basan frecuentemente en el análisis de la composición corporal y diversos parámetros fisiológicos en descendientes de madres obesas a edades tempranas como la infancia y la adolescencia. En este contexto, se ha asociado la obesidad materna a mayor riesgo de obesidad en los descendientes. Por ejemplo: en una cohorte de 8,984 niños de 1 a 4 años de edad, se demostró que el 24.1% de los descendientes de madres con obesidad gestacional eran obesos a los 4 años de edad, mientras que solo el 9.0% de los descendientes de madres de peso gestacional normal fueron obesos. En otra cohorte de 4,871 familias, se observó en los hijos de madres con obesidad pre-gestacional, que el riesgo de obesidad fue 3.84 veces mayor al de los hijos de madres de peso normal a la edad de 6 años (Gaillard et al., 2014).

Se ha sugerido que el Índice de Masa Corporal (IMC) materno previo al embarazo, así como la ganancia de peso durante la gestación aún en madres no necesariamente obesas, están asociadas directamente con la adiposidad y la distribución de grasa corporal en los descendientes durante la infancia (Godfrey et al., 2017). De tal manera que se ha establecido una relación directa entre el IMC materno y la cantidad de grasa corporal de los descendientes, la cual ha sido determinada mediante técnicas no invasivas para el análisis de la composición corporal. Por ejemplo: en una cohorte con 1090 pares de madres e hijos se determinó que un exceso de 5 kg/m² en IMC materno pre-gestacional se asocia a un incremento de 0.92 kg de grasa corporal en los hijos de los 6 a 10 años de edad; así mismo, se observó que un exceso de 5 kg en la ganancia de peso corporal materno durante la gestación produjo en los hijos, un incremento de 0.33 kg de grasa total y un incremento de 6 % en la concentración de leptina (Perng, Gillman, Mantzoros, & Oken, 2014).

De acuerdo a todas estas observaciones, es plausible que las consecuencias de la obesidad materna en los descendientes permanezcan e incluso se agudicen a largo plazo. A este respecto, se ha demostrado que el exceso de peso infantil durante la edad de 3 tres años en adelante está relacionado con riesgo posterior a enfermedad

coronaria (Baker, Olsen, & Sorensen, 2007), diabetes mellitus tipo 2 (Bhargava et al., 2004) y síndrome metabólico (Sachdev et al., 2009).

Aunque desde el enfoque epidemiológico del concepto DOHaD, se han asociado diversas condiciones fisiológicas maternas con el fenotipo de los descendientes, la investigación prospectiva de cohortes en poblaciones humanas, resulta compleja, costosa e involucra la influencia de variables no controlables tanto de origen genético como ambiental (P. D. Taylor & Poston, 2007) por lo que dentro del campo de investigación del concepto DOHaD, resulta necesario el uso de modelos experimentales, principalmente para disminuir la influencia de variables de tipo genético y ambientales.

Se han desarrollado diversos modelos con animales experimentales para recrear las condiciones epidemiológicas asociadas a la obesidad materna. Existen ventajas metodológicas que sólo se pueden obtener al utilizar modelos animales en los estudios realizados dentro del contexto del concepto DOHaD. Por ejemplo, mediante las cruzas consanguíneas, es posible reducir la variabilidad genética de los sujetos experimentales. Tal vez, la razón más importante consiste en que el uso de modelos animales ofrece la posibilidad de controlar estrechamente las condiciones ambientales (Paul D. Taylor et al., 2018). En este sentido, los modelos animales resultan ventajosos sobre los estudios epidemiológicos, porque a tales se puede controlar en gran medida las variables confusoras y es posible establecer relaciones causa-efecto con mayor precisión. Por lo tanto, estos modelos permiten diseñar experimentos desde una visión mecanicista y en donde se pueden generar hipótesis comprobables que pueden traducirse en estudios clínicos (Paul D. Taylor et al., 2018).

Es común el uso de roedores como modelos de obesidad materna, por diversas razones. Una de ellas es porque los roedores comparten con los seres humanos el 99% de genes y presentan diversos sistemas fisiológicos altamente conservados. Además, tienen ciclos de vida relativamente cortos. En el campo de estudio

específico para la obesidad materna, el uso de roedores es considerado adecuado para la evaluación de los efectos metabólicos programados, debido a la similitud de diversos parámetros bioquímicos existentes entre el perfil metabólico de ratas y el de humanos durante los periodos de gestación y lactancia (Corvino et al., 2015).

TEJIDO ADIPOSO DE LOS DESCENDIENTES DE MADRES OBESAS

El ambiente uterino puede sustancialmente modificar la manera en que el genoma fetal es expresado, lo que puede ejercer efectos estimulatorios en el crecimiento fetal y en la adiposidad (Heerwagen et al., 2010). El tejido adiposo representa uno de los órganos (Cinti, 2005) más susceptibles para ser programados por la obesidad materna (Butte, 2000), el cual se caracteriza por su gran capacidad para adaptarse y expandirse en respuesta a estímulos ambientales, especialmente ante una provisión energética excesiva, ya sea mediante la hipertrofia del tejido adiposo y/o el reclutamiento y proliferación de células precursoras (Pellegrinelli, Carobbio, & Vidal-Puig, 2016).

Debido a la gran capacidad de respuesta del tejido adiposo y a la gran plasticidad fenotípica de los precursores de los adipocitos, diversas alteraciones en el suministro de nutrientes en etapas perinatales pueden afectar su trayectoria de desarrollo (Lecoutre et al., 2016), ocasionando alteraciones tanto en el número como en la fisiología del adipocito en la vida posnatal (Lecoutre & Breton, 2014, 2015; Lukaszewski, Eberlé, Vieau, & Breton, 2013).

La etapa de la vida en la que se establece la capacidad de almacenamiento de grasa en el tejido adiposo constituye una ventana crítica de desarrollo ante un posible ambiente adverso. En los roedores esta capacidad de almacenamiento, se lleva a cabo principalmente durante la última semana de gestación (que corresponde al último tercio de la gestación) y se acelera en la lactancia; sin embargo, existe evidencia convincente de que la producción de precursores de los

adipocitos y la diferenciación de éstos a adipocitos maduros se lleva a cabo a lo largo de toda la vida (Muhlhausler & Smith, 2009).

Es importante señalar que en los humanos, se considera que durante la infancia y la adolescencia se establece el número de adipocitos del cuerpo mediante la proliferación celular de los precursores de los adipocitos, incluso se ha sugerido que este proceso ocurre en 2 intervalos, uno antes de los dos años de edad y otro durante la pubertad (Hirchi, 1970; Knittle, Timmers, Ginsberg-Fellner, Brown, & Katz, 1979). Posteriormente, en la edad adulta, el número de adipocitos se mantiene relativamente constante, el cual es mantenido mediante la producción sostenida de precursores de adipocitos y la diferenciación de los mismos a adipocitos maduros, lo que resulta en el recambio constante de la población de los adipocitos que van muriendo (Spalding et al., 2008). No obstante la tasa de recambio de adipocitos puede ser diferente entre individuos, y dichas diferencias pueden estar asociadas a diversas alteraciones metabólicas como la resistencia a la insulina y dislipidemia. (E. Arner et al., 2010) De esta manera, tanto el número de adipocitos que se establece en edades tempranas, así como el mecanismo que controla la tasa de recambio de adipocitos son importantes no sólo porque representan blancos terapéuticos para el tratamiento de la obesidad, sino también porque dentro del contexto del concepto DOHaD ofrece una posibilidad de intervención durante la infancia y la adolescencia,

En general el tamaño de los órganos puede ser regulado por diferentes mecanismos y el número de células en algunos tejidos es controlado mediante circuitos de retroalimentación sistémicos (Joulia-Ekaza & Cabello, 2006). En el tejido adiposo, a pesar de que se considera ampliamente que el número de adipocitos es un determinante importante de la masa grasa en la edad adulta, este posee una gran capacidad de expansión a lo largo de la vida, en comparación con otros órganos. Consecuentemente, cualquier perturbación que modifique el número y la fisiología normal de los adipocitos y sus precursores en el desarrollo temprano, potencialmente modificarán la capacidad de almacenamiento de grasa y el papel del tejido adiposo en la regulación del metabolismo energético.

Debido a que los adipocitos maduros son células pos mitóticas terminalmente diferenciadas (es decir, una vez que alcanzan la madurez ya no se pueden dividir), la diferenciación de los precursores del adipocito es requerida para aumentar el número de células, el cual es un mecanismo característico del crecimiento del tejido adiposo durante el desarrollo temprano (Smorlesi et al., 2012). Por otra parte el aumento de tamaño del adipocito es un mecanismo de crecimiento que predomina en etapas posteriores al desarrollo temprano, Sin embargo, la producción de nuevos adipocitos se mantiene a lo largo de la vida. De hecho, los precursores de los adipocitos se encuentran presentes en el tejido adiposo en la edad adulta y su función es reemplazar a los adipocitos que mueren, en humanos, aproximadamente el 10% de los adipocitos son reemplazados cada año (Majka, Barak, & Klemm, 2011). Dichos precursores consisten en células madre y precursores mesénquimales que tienen un gran capacidad de diferenciación hacia diferentes linajes (endotelial, adiposo, cartílago y hueso). (Pellegrinelli et al., 2016). El proceso por el cual se producen nuevos adipocitos a partir de los precursores del adipocito se denomina adipogénesis. Dicho proceso, ha sido ampliamente investigado en varios modelos experimentales, principalmente mediante el uso de líneas celulares y se han descrito 4 etapas principales para su estudio; la fase de arresto del crecimiento de los precursores del adipocito, expansión clonal de los preadipocitos, la diferenciación temprana y diferenciación terminal.

Previo al inicio de la adipogénesis, se ha descrito una fase proliferativa en las células madre y precursores mesénquimales. Entre los mediadores clave más importantes, para la fase proliferativa podemos referir a los miembros de la familia de las proteínas morfo génicas del hueso (BMP por sus siglas en inglés) que incluso tienen una gran capacidad de inducir fuertemente la formación de hueso nuevo, cartílago y tejido conjuntivo (Chen, Zhao, & Mundy, 2004); de igual forma, se ha descrito que varios genes miembros de la familia de las proteínas *Wingless e Int* (Wnt) también son inductores de la proliferación en esta etapa

De hecho, se ha descrito que las proteínas de la vía Wnt son capaces de orquestar e influir en una gran variedad de procesos biológicos y de desarrollo celular a lo

largo de la adipogénesis (Willert & Nusse, 2012). Uno de los componentes imprescindibles de dicha vía es el complejo correceptor formado por una proteína relacionada con el receptor de LDL (LRP5/6) y un receptor *Frizzled* (Fz). Cuyo funcionamiento adecuado induce la activación de mecanismos de transcripción genética en el núcleo, mediados por β -catenina (Escobar-Gómez, Jódar, & Hawkins, 2009).

De acuerdo a estudios en cultivo celular, en el proceso de la adipogénesis, inicialmente ocurre el arresto del crecimiento de los precursores, el cual es inducido por inhibición por contacto al alcanzar la confluencia. En esta etapa, los pre adipocitos se caracterizan por presentar una fase de crecimiento celular detenido. Durante esta etapa ocurre el proceso de compromiso el cual es iniciado por diversos factores o moléculas de señalización que inducen la conversión de células madre y precursores mesenquimales en preadipocitos es decir células que adquieren la capacidad para diferenciarse exclusivamente en células correspondientes al linaje del tejido adiposo..

Después de que los preadipocitos adquieren el compromiso para diferenciarse en adipocitos, éstos son capaces de llevar a cabo algunos ciclos de división mitótica inducida por señales hormonales y bioquímicas en un proceso denominado expansión clonal. Es importante resaltar que los inductores apropiados son requeridos para llevar a cabo este proceso así como para continuar con las fases subsecuentes de diferenciación. La exposición a diversas moléculas de señalización, como el factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1 por sus siglas en inglés), glucocorticoides y adenosín monofosfato cíclico (AMPc), inician la replicación del DNA y por lo tanto la reentrada al ciclo celular, haciendo posible la expansión mitótica clonal. Para que la expansión clonal se lleve a cabo, se requiere de la expresión secuencial de varios genes específicos. Así mismo, otros procesos moleculares resultan críticos en esta etapa, tales como la fosforilación del factor de transcripción conocido como la proteína de unión al potenciador CCATT de tipo β (C/EBP- β por sus siglas en inglés) por la cinasa de proteínas activada por mitogenos (MAPK por sus siglas en inglés) y la cinasa de la glucógeno sintasa 3 tipo β , en

(GSK3 β , por sus siglas en inglés), para producir el cambio conformacional en C/EBP- β y conferirle su capacidad de unión al DNA (Tang & Lane, 2012).

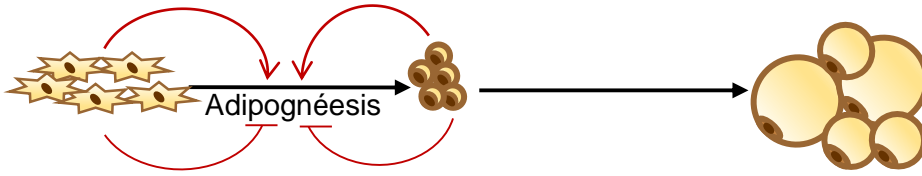
Después de la expansión clonal, se ha reportado que tiene lugar una etapa de diferenciación temprana, caracterizada por el arresto de la división celular y el comienzo de la expresión de algunos genes característicos del adipocito y la acumulación de lípido. Durante esta etapa, proteínas como la C/EBP- β que es activada por la fosforilación es capaz de promover la transcripción de los genes C/EBP- α y PPAR- γ , las cuales son proteínas reguladoras más importantes en la adipogénesis (Shao and Lazar, 1997; Varley et al., 2004), debido a que activan la expresión de genes correspondiente al fenotipo de un adipocito.

Finalmente la morfología típica del adipocito es alcanzada durante la fase de diferenciación terminal, en la que se induce la transcripción de genes característicos del adipocito maduro. La diferenciación del adipocito juega un papel importante en el funcionamiento adecuado del tejido adiposo en términos del balance energético corporal, ya que la transición de los preadipocitos a adipocitos maduros se caracteriza por la expresión de enzimas reguladoras del metabolismo de lípidos y carbohidratos, como la sintasa de ácidos grasos, la lipasa sensible a hormona, y diversas proteínas participantes en la señalización de insulina, entre otras. Así mismo, los adipocitos maduros generan señales de retroalimentación a nivel endócrino, que modulan el metabolismo energético mediante la secreción de adipocinas y otros mecanismos de señalización parácrina y autócrina. Por ejemplo la leptina, la cual es capaz de regular el gasto energético y la ingesta alimentaria (Shankar et al., 2010). (Joe, Yi, Even, Vogl, & Rossi, 2009), previniendo así el desarrollo de las alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad hipertrófica (M.-Y. Wang et al., 2008). Por otra parte la hipertrofia del tejido adiposo se ha asociado con rasgos característicos de disfunción celular, como la resistencia a la insulina (Franck et al., 2007) y perfiles de secreción de adipocinas alterados (Skurk, Alberti-Huber, Herder, & Hauner, 2007).

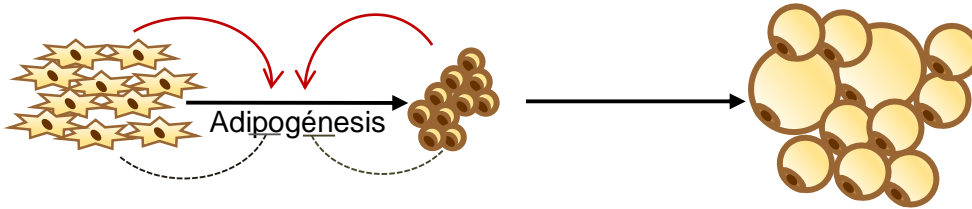
El tamaño del adipocito es una característica de gran importancia en el estudio del desarrollo y funcionalidad del tejido adiposo, debido a que es un rasgo morfológico ligado directamente a la fase de diferenciación terminal de la adipogénesis, ya que durante ésta se adquiere el aspecto morfológico característico de las células del tejido adiposo, así como sus funciones fisiológicas. Además de que el tamaño del adipocito define al estado hipertrófico.

El aumento del número y tamaño de los adipocitos, son considerados como procesos independientes; sin embargo, el balance adecuado entre el aumento de tamaño y número de adipocitos, está regulado por ciclos de retroalimentación positiva y negativa ejercidos tanto por los pre adipocitos como por los adipocitos maduros. El análisis de la distribución de tamaños del adipocito provee información importante acerca de las diferencias en la regulación de la adipogénesis, donde los ciclos de retroalimentación ejercidos por la señalización de los adipocitos diferenciados y los precursores juegan un papel fundamental (Fig. 2).

A. Balance adecuado entre el tamaño y número de adipocitos



B. Incremento en el número de adipocitos



C. Formación de adipocitos hipertróficos

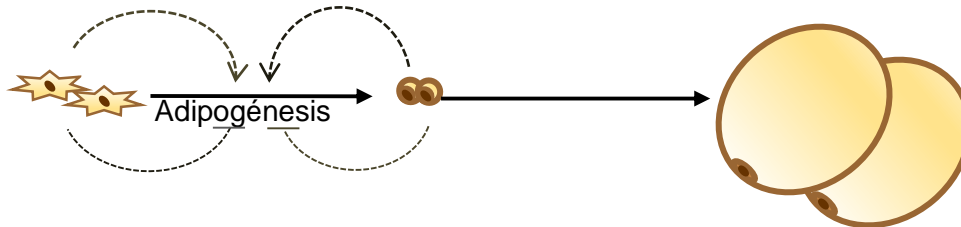


Figura 2. Mecanismos de expansión del tejido adiposo. La cantidad de tejido adiposo en condiciones fisiológicas está regulado por ciclos de retroalimentación que determinan (A) el balance adecuado del número y tamaño del adipocito. Sin embargo, durante la expansión del tejido adiposo dichos ciclos de realimentación pueden producir (B) el aumento del número y/o (C) en el tamaño del adipocito.

El análisis de la distribución de tamaños del adipocito provee información importante acerca de las diferencias en la regulación de la adipogénesis, donde los ciclos de retroalimentación ejercidos por la señalización de los adipocitos diferenciados y los precursores juegan un papel fundamental. La distribución del adipocito en condiciones fisiológicas parece ser asimétrica asemejando la distribución gamma (Fig. 3)

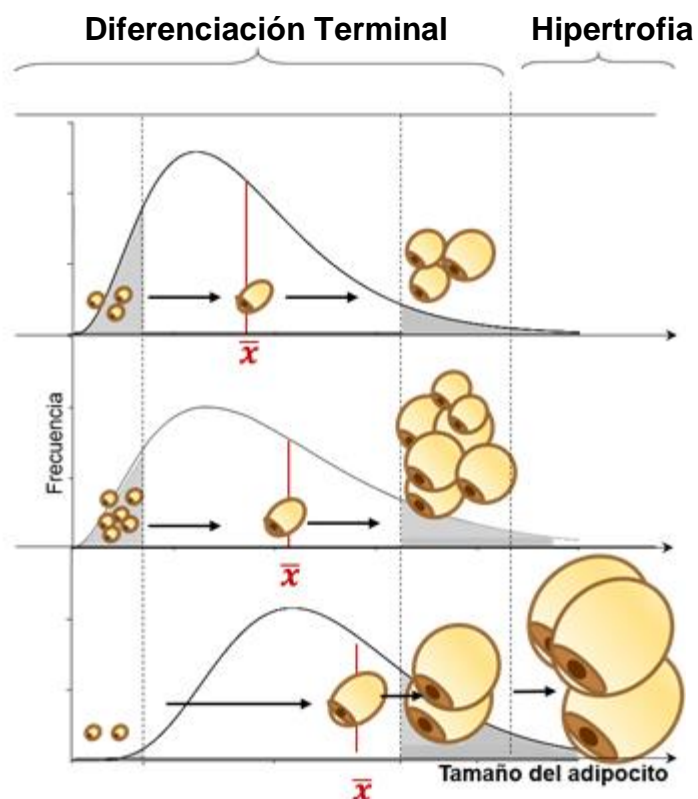


Figura 3. Distribución de tamaños del adipocito y su diferenciación terminal. El proceso de diferenciación se caracteriza por un aumento de tamaño es posible asociar la distribución de tamaños del adipocito con diferencias en la diferenciación terminal,

El análisis histológico del tejido adiposo depende de la caracterización de la distribución del tamaño del adipocito, no solo en términos de su desplazamiento (que indique si los adipocitos son más grandes o pequeños en general). Dicha caracterización depende de un modelo matemático que permita hacer comparaciones términos de la forma y amplitud de la distribución.

La importancia del análisis de la distribución de tamaño del adipocito radica en que un análisis la morfología del tejido adiposo, que incluya tanto el número y tamaño de adipocitos de una muestra dada, puede proveer información acerca de su mecanismo de expansión, el cual puede ser predominantemente hiperplásico cuya histología se caracteriza por la presencia un numero incrementado de adipocitos pequeños o bien puede ser predominante hipertrófico caracterizado por un número reducido de adipocitos y de gran tamaño.

Por otra parte, la caracterización del tamaño del adipocito puede proveer información relacionada al estado metabólico del organismo. Actualmente se acepta que la morfología correspondiente a un estado hipertrófico se asocia al síndrome metabólico y está positivamente correlacionada con la resistencia a la insulina y mayor concentración de colesterol y triglicéridos, incluso el tamaño en un estado hipertrófico se ha asociado con la hiperleptinemia (Erik Arner et al., 2010). Así mismo, la morfología correspondiente a un estado hiperplásico, caracterizado por la presencia de adipocitos pequeños (Fig. 4), se ha asociado a mayor sensibilidad a la insulina(Tandon, Wafer, & Minchin, 2018)

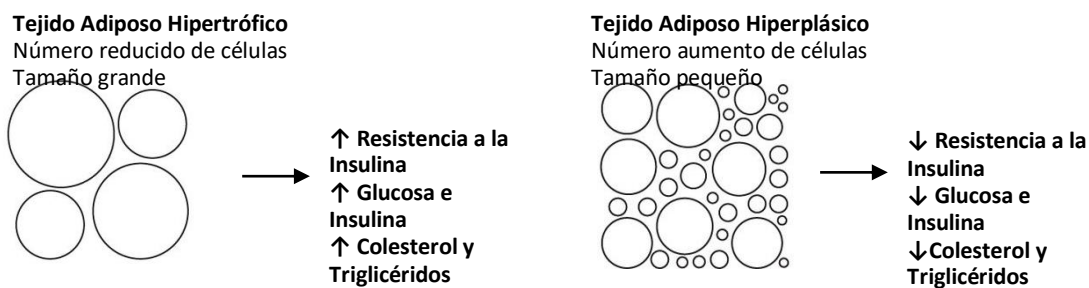


Figura 4. Morfología del tejido adiposo. La morfología del tejido adiposo es determinad por el número y tamaño de los adipocitos y pueden asociarse a un estadp metabólico ya sea hipertrófico e hiperplásico. Adaptado de Panna Tandon et al. J Exp Biol 2018;221:jeb164970

JUSTIFICACIÓN

De acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) de Medio Camino 2016, se ha observado que en México durante un periodo de 28 años (1988 a 2016), en mujeres de 20 a 49 años de edad, la prevalencia de sobrepeso se incrementó en 42.4%, mientras que la de obesidad prácticamente se triplicó . Estas cifras, que incluyen a mujeres en edad reproductiva resultan alarmantes, debido al riesgo potencial que representa la obesidad para la salud de la madre como de los descendientes.

Es indiscutible que el aumento en la acumulación de masa de tejido adiposo se origina como consecuencia de una ingesta calórica excesiva con un gasto energético deficiente, por lo que no hay duda de que el aumento de la prevalencia de obesidad, puede ser atribuida en mayor medida a la falta de un estilo de vida saludable, por ejemplo el consumo excesivo de dietas con alta densidad energética y actividad física disminuida. Sin embargo, desde el enfoque del concepto DOHaD se ha propuesto una explicación complementaria para el aumento inusitado de la prevalencia de la obesidad a nivel mundial. En donde es plausible que la prevalencia de obesidad puede ser favorecida mediante la transmisión intergeneracional de rasgos fenotípicos asociados al estado nutricional materno y paterno. A este respecto, se ha sugerido que existe un ciclo de transmisión intergeneracional de obesidad y diabetes.

Para interrumpir dicho ciclo de transmisión intergeneracional de alteraciones metabólicas es necesaria una mayor comprensión de las asociaciones entre el ambiente materno y el fenotipo de los descendientes, así como elucidar los mecanismos que producen la alteraciones metabólicas en respuesta a la obesidad materna, debido que ambas acciones son cruciales para diseñar estrategias terapéuticas eficaces para la prevención y tratamiento de alteraciones metabólicas en los hijos nacidos de madres con obesidad o sobrepeso.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como se expuso previamente, la obesidad materna programa en los descendientes diversas alteraciones metabólicas, como la resistencia a la insulina e hiperlipidemia. Dado que el principal rasgo característico programado por la obesidad materna es la acumulación excesiva de grasa e hipertrofia del tejido adiposo. El mecanismo de expansión del tejido adiposo supone uno de los principales blancos terapéuticos para contrarrestar los efectos adversos programados por la obesidad materna.

El tejido adiposo ejerce un papel muy importante en la regulación del metabolismo energético. Las funciones del adipocito además de almacenar y liberar lípidos, también son de carácter endócrino y consisten en la secreción de adipocinas y efectuar respuestas incluso a nivel autocrino y parácrino. Se sabe que la obesidad materna programa mayor acumulación de grasa corporal en la edad adulta, sin embargo, la disfunción metabólica programada no solo depende de la cantidad de grasa corporal, sino de diversos aspectos reguladores del metabolismo que ejerce el tejido adiposo. En este sentido, el mecanismo de expansión del tejido adiposo, que incluye tanto al proceso adipogénico que genera nuevos adipocitos a partir de sus precursores como al que origina la hipertrofia del tejido adiposo mediante el aumento de tamaño del adipocito, son de gran importancia para que el tejido adiposo adquiera sus funciones reguladoras, ya que tanto la capacidad de almacenamiento y metabolismo de lípidos, así como sus funciones endócrinas dependen del grado de diferenciación del adipocito,. Debido a que los adipocitos son células postmitóticas terminalmente diferenciadas, la adipogénesis es un mecanismo fundamental por el cual se regula la homeostasis del tejido adiposo y por lo tanto juega un papel fundamental en la programación metabólica por la obesidad materna.

En el caso de la obesidad, la función reguladora de este tejido se afecta originando alteraciones metabólicas como la dislipidemia y la resistencia a la insulina. Las consecuencias metabólicas dependen en gran medida del mecanismo de expansión

del tejido adiposo, el cual puede darse ya sea por un aumento en tamaño de los adipocitos, mediante el proceso denominado hipertrofia o por el aumento en el número de adipocitos mediante el proceso denominado hiperplasia, o ambos.

Dado que la hipertrofia e hiperplasia del tejido adiposo tienen consecuencias metabólicas distintas es necesario analizar la expansión del tejido adiposo a nivel celular y molecular. Técnicamente no es factible analizar in vivo encada adipocito procesos que modifican la capacidad de almacenamiento y expansión del tejido adiposo, así como el incremento o disminución de tamaño y la muerte de celular. Desde el enfoque del concepto DOHaD, en particular en los descendientes de madres obesas, el análisis de dichos procesos durante un tiempo largo sería una condición necesaria para el análisis del mecanismo de expansión programado. Sin embargo, es posible examinar de manera detallada la dinámica de crecimiento del tejido adiposo mediante el uso de mediciones precisas del tamaño del adipocito (Jo, Shreif, & Periwal, 2012). Por lo que resulta necesario contar con un modelo matemático accesible que sea fácil de emplear y que permita analizar el patrón de distribución de tamaños del adipocito. Por otra parte, los análisis morfológicos del tejido adiposo a nivel histológico podrán asociarse a la regulación adipogénica a nivel molecular y a los parámetros bioquímicos y hormonales más importantes para el metabolismo energético.

HIPOTÉISIS

La obesidad materna programa en los descendientes, deficiencias en la producción de nuevos adipocitos ocasionando un aumento excesivo de tamaño en los adipocitos existentes, así como alteraciones en la diferenciación terminal que origina adipocitos disfuncionales que contribuyen a la resistencia a la insulina y dislipidemia.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Elucidar el mecanismo de expansión del tejido adiposo que promueve la hipertrofia y por lo tanto la disfunción metabólica en machos y hembras descendientes de madres obesas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la cantidad de grasa corporal en descendientes de madres obesas
- Analizar parámetros bioquímicos asociados a la resistencia a la insulina y dislipidemia en descendientes de madres obesas
- Caracterizar el tamaño del adipocito del tejido adiposo en descendientes de madres obesas
- Determinar el perfil de expresión génica asociado a la expansión del tejido adiposo
- Cuantificar la expresión los genes maestros que regulan la adipogénesis en los precursores del tejido adiposo

MÉTODOS

MODELO BIOLÓGICO

Animales experimentales

Se emplearon ratas de la cepa Wistar provenientes de la colonia mantenida en el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio del INCMNSZ. Los animales empleados se mantuvieron en ciclos de luz oscuridad controlados, con luces encendidas de 07:00 a 19:00 h, en un rango de temperatura 18-22°C y humedad relativa 40-70%.

Los animales fueron alojados en cajas estándar de acrílico (adecuadas para ratas) con una cama de aserrín de madera virgen (Northeastern Products) cambiada periódicamente. Se colocaron 3 animales por cada caja hasta antes del apareamiento, período a partir del cual sólo se colocó a una hembra por caja. Las hembras de la generación materna (F0) utilizada en este experimento se produjeron apareando hembras de entre 16 y 17 semanas de edad, de 200-240 g de peso corporal con machos de fertilidad probada de diferente camada. Tanto hembras como machos fueron alimentados con dieta Chow (Purina 5001).

Aprobación por el comité de ética

Todos los procedimientos experimentales con animales se llevaron a cabo de acuerdo a las recomendaciones de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). El protocolo correspondiente (BRE-112/CINVA 271) fue aprobado por el comité de ética de experimentación en animales del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ).

Diseño experimental

Se emplearon ratas hembras F0 recién destetadas de 21 días de edad (d); alimentadas, ya sea con dieta Chow con 4 kcal/g, al 5% de grasa, para formar el grupo Control (C) o con dieta alta en grasa con 5kcal/g, al 25%, para formar al grupo de Obesidad Materna (OM). Ambos grupos experimentales se aparearon a los 120 d con machos adultos no experimentales.. Para evaluar los efectos de la dieta alta en grasa, en los grupos maternos (F0) se determinó la curva de crecimiento, así como el peso corporal durante la gestación y la lactancia. Al final de la lactancia determinó el índice de adiposidad (IA) ,como se describe más adelante, además de diversos parámetros bioquímicas y hormonales en sangre.

Las crías resultantes (n=8 camadas/grupo) fueron amamantadas por su respectiva madre hasta los 21 d, momento en el que fueron destetadas Después de los 21 d todas las crías F1 de se alimentaron con dieta control hasta el final del experimento y se asignaron al grupo experimental C y OM de acuerdo a la alimentación materna Para evaluar los efectos de la alimentación materna en el fenotipo de las crías se determinaron diversos parámetros asociados a la composición corporal y el metabolismo energético, así mismo se llevaron diversos análisis histológicos y moleculares del tejido adiposo (Fig.5).

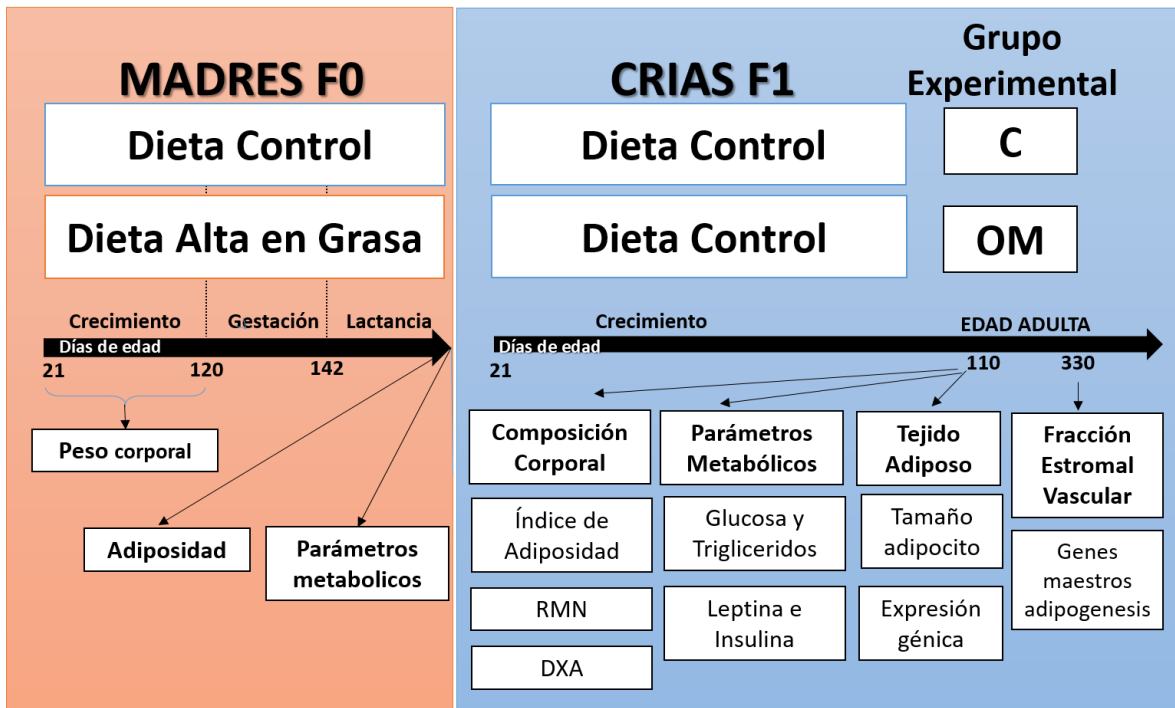


Figura 5. Diseño experimental. Las hembras experimentales F0 fueron alimentadas ya sea con dieta Chow para el grupo control(C) o alta en grasa para el grupo de Obesidad Materna(OM). Las crías macho y hembra F1 se destetaron a los 21 días posnatales con dieta control.

Dietas Experimentales

La dieta control consistió en alimento comercial para roedor Chow (Purina 5001) cuyo contenido energético fue de 4 Kcal/g. La dieta alta en grasa fue preparada en el laboratorio, con caseína (11.5 %), caseinato de calcio (11.5 %), diclorhidrato de L-cistina (0.3 %), mezcla de minerales AIN-76 (5.0 %), mezcla de vitaminas AIN-93 VX (1 %), clorhidrato de colina (0.17 %), α -celulosa (5 %), almidón de maíz (20.4 %), glucosa anhidra (20.4 %), aceite de soya (5 %) y manteca de cerdo (20 %). cuyo contenido energético fue de 5 Kcal/g (Tabla 1).

Tabla 1. Composición nutricional de las dietas

Componente	Dieta	
	Control (%_(p/p))	Alta en grasa(%_(p/p))
Proteína	22.0	23.4
Grasa Vegetal	5.0	5.0
Grasa Animal	0	20.0
Polisacáridos	31.0	20.59
Azúcares simples	31.0	20.59
Fibra dietética	4.0	4.42
Minerales	6.0	5.0
Vitaminas	1.0	1.0
Contenido Energético	4 Kcal /g	5 Kcal/g

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

Eutanasia de los animales experimentales

La eutanasia de los animales experimentales se llevó a cabo de acuerdo al diseño experimental descrito con ayuno previo de 6 horas (06:00-12:00 h sólo con acceso al agua). El procedimiento se realizó a los animales correspondientes bajo anestesia profunda con pentobarbital sódico (62 mg/kg) administrado por vía intraperitoneal, en una guillotina para roedor (Thomas Scientific).

Índice de adiposidad

Inmediatamente después de la eutanasia de las madres experimentales y las crías se disecó el tejido adiposo de las, según el sexo (Tabla 2) se extrajo el tejido adiposo de diferente localización y todos ellos fueron pesados individualmente en una balanza analítica.

Tabla 2. Distribución corporal del tejido adiposo. Se indica el peso corporal de los depósitos extraídos al momento de la disección en hembras y machos.

Localización de los depósitos de grasa	Sexo	
	Machos	Hembras
Retroperitoneal	✓	✓
Pancreático	✓	✓
Esternón	✓	✓
Mesentérico	✓	✓
Epidídimo	✓	
Ovárico		✓
Uterino		✓

Para cada rata se determinó el IA mediante la suma del peso de cada depósito y el peso corporal.(Ec. 1)

Ecuación 1. Índice de Adiposidad

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

Con éste parámetro calculado se puede hacer una mejor estimación del desarrollo del fenotipo obeso en los animales experimentales, debido a que está estrechamente relacionado con el metabolismo de lípidos y carbohidratos (Kumar, Sunvold, & Scarpace, 1999; B. A. Taylor & Phillips, 1996).

Recolección y almacenamiento de muestras biológicas

De acuerdo al diseño experimental, tanto en las madres experimentales F0 como en los descendientes F1 muestras sanguíneas al momento de la eutanasia, las cuales se centrifugación a 2000XG por 15 minutos a 4° C para separar el suero, el cual fue conservado a -20°C hasta el momento de su análisis.

Posteriormente, las muestras almacenadas fueron descongeladas a 4° C y se llevó a cabo la cuantificación espectrofotométrica de los metabolitos analizados, así como

determinación por radioinmunoensayo (RIA por sus siglas en inglés) de hormonas. Así mismo, durante la eutanasia de las crías se recolectaron muestras de tejido adiposo retroperitoneal que de acuerdo al diseño experimental se almacenaron a -70°C o se procesaron inmediatamente en fresco.

Determinaciones bioquímicas en sangre

La determinación de la concentración sanguínea de glucosa, colesterol total y triglicéridos, así como sus muestras de control de calidad correspondientes, fueron realizadas con un sistema automatizado (Beckman-Coulter, Synchron CX 5 Delta). Las determinaciones se llevaron a cabo con reactivos diseñados especialmente para este sistema, el cual realiza el análisis espectrofotométrico a partir de ensayos enzimáticos que se describen a continuación.

La concentración de glucosa se determinó por un método de punto final a tiempo fijo utilizando el reactivo comercial (Synchron GLU 467825), compuesto por: ATP 3.8 mM, NAD⁺ 2.7 mM, hexocinasa 2.0 KUI/L, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 3.0 KUI/L, además de otras sustancias no reactivas necesarias para el funcionamiento óptimo del sistema. Para esta determinación se utilizó una proporción correspondiente a 1 parte de muestra por cada 100 partes de reactivo.

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

Para la determinación de triglicéridos se utilizó un reactivo comercial (Synchron GPO 445850), mediante un método de punto final a tiempo fijo donde el sistema dispensa automáticamente los volúmenes en proporción de 1 parte de muestra por cada 100 partes de reactivo. Este se compone de: lipasa 68 U/L, ATP 2.56 mM, glicerol cinasa 4 KUI/L, glicerofosfato oxidasa 1.1 KUI/L, 4-AAP 0.71 mM, ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenzeno sulfónico (DHBS) 1.56 mM, peróxidasa de rábano 9 KUI/L, además de otras sustancias no reactivas necesarias para el funcionamiento óptimo del sistema. Por la adición del reactivo los triglicéridos de la muestra son hidrolizados a glicerol y ácidos grasos libres por acción de la lipasa dándose así una secuencia de tres pasos enzimáticos, donde el glicerol es transformado por la glicerol cinasa en glicerol-3-fosfato, y este por acción de la glicerolfosfato oxidasa se transforma en dihidroxiacetona y H_2O_2 , de esta forma la peroxidasa de rábano causa el acoplamiento oxidante a partir del peróxido de hidrógeno generado junto con el DHBS y la 4-AAP para formar un colorante rojo de quinoneína.

Determinaciones hormonales en sangre

Las concentraciones de insulina y leptina se determinaron por RIA. En dicha técnica, una concentración establecida de antígeno marcado radiactivamente se mezcla con una concentración desconocida de antígeno de la muestra (analito) e incubada con una dilución constante de antisuero. Para la determinación de leptina: se utilizó un estuche de RIA específico para muestras rata (LINCO RL-83K), el cual utiliza leptina marcada con el isótopo radiactivo ^{125}I y un antisuero específico para leptina con una sensibilidad de 0.5 ng/mL. Para la determinación de insulina: se utilizó un estuche de RIA específico para muestras de rata (LINCO RI-13K), en el cual se emplea insulina marcada con el isótopo radiactivo ^{125}I y un antisuero específico para leptina con una sensibilidad de 0.1 ng/mL. Cabe señalar que tanto el estuche para insulina y leptina contienen sus propios estándares de con los cuales se elaboró la

curva patrón. Para ambas determinaciones, se usó un contador de radiaciones y (Packard Instruments).

El índice de resistencia a la insulina (IRI) se determinó (Ec. 2) tomando en cuenta que 1 ng/mL de insulina equivale a 18 μ U/mL y 1ng/mL de glucosa a 25 μ mol/L. De acuerdo al modelo de análisis homeostático (HOMA por sus siglas en inglés) el producto de la glucosa en mM y la insulina en mUI/L es dividido por 22.5 (Matthews et al., 1985).

Ecuación 2. Índice de resistencia a la insulina

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

Análisis estadísticos

Para analizar los efectos de la dieta materna tanto en las madres experimentales F0 como en sus descendientes F1, se hicieron comparaciones entre los datos obtenidos de los grupos C y OM. Los grupos maternos tuvieron un tamaño de muestra de n=8 hembras F0 por grupo. En el caso de los grupos de los descendientes, un macho y una hembra F1 de diferente cada camada fueron escogidas al azar para obtener un tamaño de muestra de n=8 por grupo de cada sexo.

Las determinaciones cuyos datos tuvieron distribución normal, condición determinada por la prueba de Levene, se reportaron como la media con error estándar (EE) y se analizaron mediante la prueba de t de Student. Mientras que los datos que no tuvieron distribución normal fueron reportados como la mediana con rango intercuartílico y se analizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney. En todos los casos se consideró un valor de p<0.05 como significativo, para cada una de las comparaciones estadísticas empleadas.

METABOLISMO DE LAS HEMBRAS EXPERIMENTALES F0

Peso corporal materno

El peso corporal de las hembras F0 se obtuvo semanalmente desde el destete hasta los 120 d. Posteriormente, el peso corporal se obtuvo diariamente desde el inicio de la gestación destete hasta el final de la lactancia. El inicio de la gestación se determinó al observar la presencia de espermatozoides en el frotis vaginal teñido con solución de Lugol, tomado la mañana siguiente a partir de que las hembras fueron colocadas junto con los machos no experimentales. Las hembras que después de tres días no fueron preñadas después de tres días de haber permanecido con el macho, fueron excluidas del estudio.

Adiposidad y metabolismo de las hembras F0 al final de la lactancia

Al final de la lactancia se determinó la concentración sérica de glucosa, triglicéridos, los parámetros hormonales insulina y leptina. Asimismo, se obtuvo el índice de adiposidad como se indica más adelante

METABOLISMO DE LOS DESCENDIENTES F1

Peso corporal e ingesta de alimento

Al día del nacimiento y a los 110d de las crías F1 provenientes de los grupos C y OM. La ingesta de alimento se determinó en los descendientes desde los 100 a los 110 d, calculando la cantidad de alimento consumido cada 24 horas. La determinación de la ingesta de alimento promedio, se llevó a cabo colocando 3 animales del mismo grupo en una caja y pesando la cantidad de alimento presente

en el comedero cada día a las 10:00 horas, reponiéndolo de tal manera que la cantidad de este no fuera inferior a 50 g. El cálculo de la ingesta de alimento promedio por día se realizó de acuerdo a la Ec.3 reportándose como (g /d).

Ecuación 3. Ingesta de alimento por día

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

Donde:

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

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

n =animales en la caja durante la determinación

Composición corporal y metabolismo de las crías

A los 110 d se determinó la composición corporal *in vivo* por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y por Absorciometría dual de Rayos X (DXA) como se describe mas adelante. Con los datos registrados de la cantidad de tejido adiposo extraído al momento de la eutanasia a los 110d se determinó el índice de adiposidad, así mismo se tomaron muestras sanguíneas para la determinación de glucosa y colesterol y las hormonas leptina e insulina.

COMPOSICIÓN CORPORAL DE LOS DESCENDIENTES F1

Análisis por resonancia magnética nuclear

La determinación de la grasa corporal, se realizó a los 110 d de edad, por la técnica de imagenología en resonancia magnética (MRI por sus siglas en inglés) en el equipo analizador de composición corporal (EchoMRI™ 4-in-1-500). La calibración correspondiente a la detección de grasa se llevó a cabo con 400 g de aceite de

canola, realizada minutos antes de realizar todas las mediciones. Los animales se pusieron previamente en ayuno por 6 h con acceso libre al agua y al momento del ensayo se colocaron en un inmovilizador de acrílico de forma cilíndrica durante 2 minutos. La cantidad de grasa corporal se obtuvo por duplicado y el promedio de cada animal se expresó como el % correspondiente a su peso corporal obtenido en una balanza digital momentos antes de comenzar el análisis,

Análisis por absorciometría dual de rayos X

La determinación del contenido relativo de grasa corporal, se realizó a los 110 d de edad de edad por la técnica de análisis de imagen obtenida por la técnica de absorciometría de rayos X de energía dual (DXA por sus siglas en inglés) en un equipo Lunar iDXA (GE Healthcare). Los animales se pusieron previamente en ayuno de 6 h con acceso libre al agua. Al momento del ensayo, se administró por vía intraperitoneal 20 mg de pentobarbital sódico/Kg de peso corporal, con la finalidad de inmovilizarlos solo por 2 o 3 minutos. El software para el análisis de la imagen radiológica, enCore, el cual permitió que la imagen escaneada se dividiera en diversas regiones. Se analizó la región troncal utilizando una cuadrícula con algoritmos únicos para cada región. La cantidad de grasa corporal expreso como la proporción de grasa detectada directamente por el equipo en %.

TEJIDO ADIPOSEO DE LOS DESCENDIENTES F1

Procesamiento histológico del tejido adiposo

Inmediatamente después de la recolección y determinación del peso del tejido adiposo retroperitoneal, se seccionó una porción de aproximadamente 300 mg y se fijó con 8 mL de solución al 10 %_(m/v) de para-formaldehído en PBS 0.05 mM por 24

horas a 4° C. Transcurrido este tiempo, el tejido fijado se lavó tres veces y se almacenó a 4° C con solución amortiguadora salino de fosfatos (PBS por sus siglas en inglés) 0.05 mM hasta el momento de su procesamiento.

Cada porción de tejido fijado, se sometió a proceso 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.

De cada cría, una muestra de tejido adiposo retroperitoneal embebida en parafina, se realizaron cortes histológicos de 5 µm de grosor que fueron teñidos con hematoxilina y eosina. De dichos cortes histológicos, se obtuvieron microfotografías digitales a 20X. El área transversal correspondiente a cada célula observada se delimitó (segmentó) manualmente en la imagen digital y se cuantificó por medio del software Axiovisión de Carl Zeiss ® .

Análisis del tamaño del adipocito

Con la finalidad de no solo tomar en cuenta los datos que se agrupan cerca del valor medio del tamaño del adipocito, sino también de incluir en la comparación estadística a los adipocitos de tamaños extremos, debido a que estos datos pueden tener un significado fisiológico; el tamaño del adipocito se analizó de diferentes maneras. Además de las comparaciones en el tamaño medio del adipocito, se determinaron las diferencias en la distribución, debidas a la dispersión, agrupamiento y desplazamiento de los datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov para 2 muestras, la cual se basa en la comparación de las curvas de distribución acumulada.

A continuación se describe la estrategia empleada para el análisis de la distribución, específicamente para comparar las proporciones de adipocitos pequeños y grandes

entre los grupos experimentales usando la distribución gamma como modelo matemático. Debido a que la morfología del tejido adiposo en un corte histológico, puede describirse como una superficie totalmente cubierta por células similares a polígonos convexos, es decir, con todos los vértices apuntando hacia afuera, de tal forma que los ángulos internos entre los lados adyacentes nunca son mayores a 180° . Se asumió las características de un corte histológico de tejido adiposo corresponden a un diagrama de Poisson-Voronoi (Fig. 6), cuya distribución del área de los polígonos que lo componen, se ajusta a la distribución gamma (Tanemura, 2003).

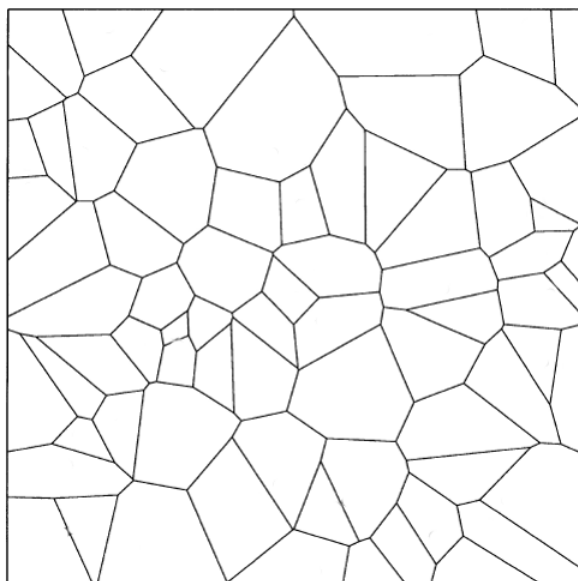


Figura 6. Diagrama de Poisson-Voronoi. Un diagrama de Poisson-Voronoi se compone únicamente por polígonos convexos, cuyos vértices siempre apuntan hacia afuera. Este tipo de diagramas es muy semejante al patrón geométrico de los cortes histológicos del tejido adiposo. Adaptada de “Statistical distributions of Poisson Voronoi cells in two and three dimensions” por Tanemura, M. 2003, Forma,18. p 222.

En el presente trabajo se evaluó el ajuste a la distribución gamma (Ec. 4) en la distribución de tamaño de los adipocitos, obtenida de animales experimentales, por ser un modelo que facilita el análisis al valerse del cálculo de la media y desviación estándar (Ferenc & Néda, 2007). La distribución gamma tiene diferentes aplicaciones, en la ciencia de materiales para el análisis de la distribución de tamaño de partículas (Lazar, Mason, MacPherson, & Srolovitz, 2013). La dispersión y forma

de la distribución de tamaños del adipocito, observados en un corte histológico se pueden estimar asumiendo el modelo de la distribución gamma (Ec 4)

Ecuación 4. Función de densidad de probabilidad gamma

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

Donde:

$f(x)$ = Probabilidad (frecuencia relativa esperada)

x = área del adipocito

a = parámetro de forma

b = parámetro de escala inverso

$\Gamma(a)$ = función gamma

$e = 2.71828 \dots$ (base de los logaritmos naturales)

La función gamma (Ec. 5) se encuentra en el denominador de la distribución gamma (Ec.1) y es una integral definida.

Ecuación 5. Función gamma

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

Donde:

t = variable real

$e = 2.71828 \dots$ (base de los logaritmos naturales)

Los valores correspondientes a los parámetros de forma (a) y de escala (b^{-1}) se pueden obtener por medio de sus estimadores estadísticos, es decir funciones obtenidas a partir de los datos de una población o una muestra representativa, los cuales se plantearon de acuerdo al método de los momentos (Ecs.6 y 7) (Panik, 2005).

Ecuación 6. Estimador del parámetro de forma

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

Ecuación 7. Estimador del parámetro de escala

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

Dónde:

n = número de adipocitos medidos

\bar{x} = área promedio del adipocito

x_i = área del i-ésimo adipocito

De las microfotografías digitales obtenidas a 20X (Fig. 7A), el área transversal correspondiente a cada célula se cuantificó (Fig. 7B) por medio del software Axiovisión de Carl Zeiss® (Fig. 7C). Asimismo, usando la distribución gamma como modelo matemático, se analizó la proporción de adipocitos de tamaño extremo, comparando a los adipocitos grandes y pequeños entre los grupos C y MO (Fig. 7D).

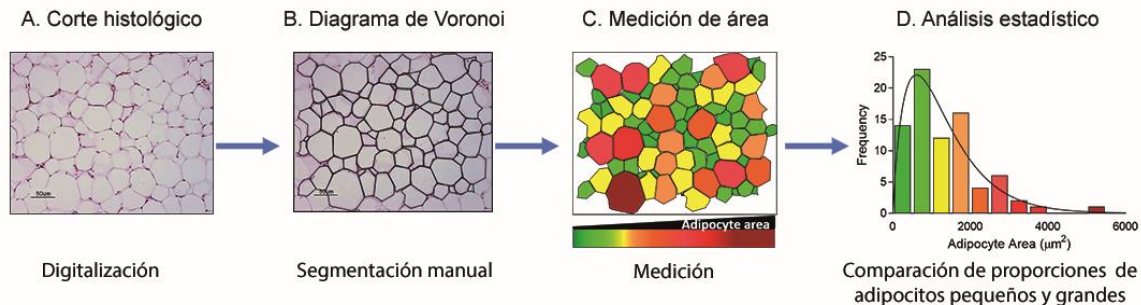


Figura 7. Análisis de la distribución del tamaño del adipocito. Microfotografías del tejido adiposo retroperitoneal a 20x teñidas con hetoxilina y eosina (A), Segmentación manual de área de los adipocitos (B) y medición del área en la imagen digital (C). Análisis estadístico (D).

EXPRESIÓN GÉNICA EN EL TEJIDO ADIPOSO DE LOS DESCENDIENTES F1

Extracción de RNA del tejido adiposo.

Al momento de la eutanasia a los 110 d de edad, se extrajeron muestras de tejido adiposo retroperitoneal, las cuales se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, y se conservaron a -70 ° C hasta el momento de su procesamiento. Se utilizaron 100 mg de muestra, para extraer el RNA con el estuche comercial (Zymo Direct-zol™ RNA MiniPrep, R2053).

El RNA extraído, se cuantificó espectrofotométricamente (Termo-Fisher Scientific NanoDrop 2000,) y se evaluó el cociente 260/230 y 260/280. El análisis de integridad del RNA extraído se llevó a cabo por electroforesis capilar usando un chip comercial (Agilent RNA 6000 Nano Estuche) en un bioanalizador fluorométrico automatizado (Agilent 2100 Bioanalyzer System). Solo se usaron muestras con número de integridad (RIN por sus siglas en inglés) ≥ 7 .

Perfil de expresión de genes asociados a la expansión del tejido adiposo.

Se utilizaron 500 ng de RNA extraído de cada muestra para sintetizar el cDNA correspondiente con un estuche comercial (Qiagen RT2 First Strand Estuche). La expresión de 84 genes adipogénicos (Tabla 3) se determinó en un arreglo de RT-PCR (Qiagen® RT2-Profiler-PCR array RAT adipogénesis) usando cDNA obtenido y el estuche comercial (Qiagen RT2 SYBR® Green qPCR Mastermix) en un sistema automatizado de PCR de tiempo real (ABI-Step One Plus).

Tabla 3. Genes asociados a la expansión del tejido adiposo. Se indican las secuencias incluidas en el arreglo RT2-Profiler-PCR array Rat adipogenesis de Qiagen®.

Secuencia (Identificador Refseq)	Símbolo	Gen (<i>descripción</i>)
NM_053922	Acacb	<i>Acc2 (carboxilasa β de acetil-coenzima A)</i>
NM_144744	Adipoq	<i>Acdc, Acrp30(adiponectina, proteína con dominio de colágeno C1Q)</i>
NM_012492	Adrb2	<i>(receptor β-adrenergico de superficie 2)</i>
NM_134432	Agt	<i>ANRT, Ang, AngII, PAT (angiotensinogeno, miembro 8 de los inhibidores de serpinpeptidasa A)</i>
NM_134454	Angpt2	<i>Agpt2, Ang-2 (angiopoietina 2)</i>
NM_024405	Axin1	<i>Axin (axina 1)</i>
NM_017178	Bmp2	<i>(proteína morfogénica de hueso 2)</i>

NM_012827	Bmp4	BOMPR4A (<i>proteína morfogénica de hueso 4</i>)
NM_001191856	Bmp7	BMP-7 (<i>Proteína morfogénica de hueso 7</i>)
NM_171992	Ccnd1	(<i>Ciclina D1</i>)
NM_053593	Cdk4	(<i>Cinasa dependiente de ciclina 4</i>)
NM_080782	Cdkn1a	Cip1, UV96, Waf1 (<i>Inhibidor 1A de cinasa dependiente de ciclina</i>)
NM_031762	Cdkn1b	CDKN4, Cdk1b, Kip1, P27KIP1, p27 (<i>Inhibidor 1B de cinasa dependiente de ciclina</i>)
NM_012524	Cebpa	DBPCEP (<i>CEBP-α</i>)
NM_024125	Cebpb	Il6dbp, NF-IL6, TCF5 (<i>CEBP-β</i>)
NM_013154	Cebpd	C, EBPd, CELF (<i>CEBP-δ</i>)
NM_001077642	Cfd	Adn, Df, EVE (<i>Factor D del sistema del complemento, adiposina</i>)
NM_031017	Creb1	Creb (<i>Proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc 1</i>)
NM_024134	Ddit3	CHOP, CHOP-10, Chop10, Gadd153 (<i>Transcripto 3 inducible por daño al DNA</i>)
NM_031720	Dio2	5DII, DIOII (<i>Deiodinasa de tipo II, iodotironina</i>)
NM_001106350	Dkk1	(<i>Homóloga1 de Dickkopf de Xenopus laevis</i>)
NM_053744	Dlk1	Pref-1, Zog (<i>Homóloga 1 a la proteína similar a δ de Drosophila</i>)
NM_001100778	E2f1	(Factor de transcripción a E2F 1)
NM_053633	Egr2	Krox20 (<i>Proteína de respuesta al crecimiento temprano 2</i>)
NM_053365	Fabp4	Albp, aP2 (<i>Proteína de unión a ácidos grasos 4</i>)
NM_017332	Fasn	(<i>Sintasa de ácidos grasos</i>)
NM_012846	Fgf1	FGF-1, HBGF-1, HBGF1 (<i>Similar al factor de crecimineto de fibroblastos 1</i>)
NM_012951	Fgf10	FGF-10 (<i>Similar al factor de crecimineto de fibroblastos 10</i>)
NM_019305	Fgf2	Fgf-2, bFGF (<i>Similar al factor de crecimineto de fibroblastos 2</i>)
NM_022197	Fos	c-fos (<i>Oncogen FBJ de osteosarcoma</i>)
NM_001101680	Foxc2	Fkh14, Fkhl14, Hfhbf3 (<i>Forkhead box C2</i>)
NM_033442	Gata2	(<i>Proteína de unión a GATA 2</i>)
NM_133293	Gata3	(<i>Proteína de unión a GATA 3</i>)
NM_024360	Hes1	(<i>Homologo a la proteína Hairy and enhancer of split 1 de Drosophila</i>)
NM_017071	Insr	(<i>Receptor de insulina</i>)
NM_012969	Irs1	IRS1IRM (<i>Substrato del receptor de insulina 1</i>)
NM_001168633	Irs2	4PS, IRS-2 (<i>Substrato del receptor de insulina 2</i>)
NM_021835	Jun	(<i>Oncogen Jun</i>)
NM_053536	Klf15	(<i>Factor similar a Kruppel 15</i>)
NM_001007684	Klf2	Lklf (<i>Factor similar a Kruppel 3, básico</i>)
NM_001105742	Klf3	Bklf, Tef-2 (<i>Factor Kruppel 4. intestinal</i>)
NM_053713	Klf4	GKLF (<i>Factor similar a Kruppel 2, pulmón</i>)
NM_013076	Lep	OB, obese (<i>Leptina</i>)
NM_012859	Lipe	HSL (<i>Lipasa sensible a hormona</i>)
NM_001002016	Lmna	(<i>Lamina A</i>)
NM_012598	Lpl	(<i>Lipasa de lipoproteína</i>)
NM_001106321	Lrp5	(<i>Proteína asociada al receptor de le lipoproteínas de baja densidad 5</i>)
NM_031020	Mapk14	CRK1, CSBP, CSPB1, Csbp1, Csbp2, Exip, Hog, Mxi2, Prkm14, Prkm15, RK, Sapk2A, p38, p38Hog, p38alpha (<i>Cinasa de proteína activada por mitogenos 14</i>)
NM_031822	Ncoa2	Tif2 (<i>Coactivador de receptores nucleares 2</i>)
NM_001271103	Ncor1	Rxrip13 (<i>Corepresor de receptores nucleares 1</i>)
NM_001108334	Ncor2	(<i>Corepresor de receptores nucleares 2</i>)
NM_057133	Nr0b2	Shp (<i>Miembro 2 del grupo B de la subfamilia de receptores nucleares 0</i>)

NM_031627	Nr1h3	LXR alpha (<i>Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3 Miembro 3 del grupo H de la subfamilia de los receptores nucleares 1</i>)
NM_001100708	Nrf1	Nfe2l1_retired (<i>Factor nuclear respiratorio 1</i>)
NM_013196	Ppara	PPARa (<i>PPAR-α</i>)
NM_013141	Ppard	Ppard (<i>PPAR-δ</i>)
NM_013124	Pparg	(<i>PPAR-γ</i>)
NM_031347	Ppargc1a	Ppargc1(<i>Coactivador 1-α del PPAR-γ</i>)
NM_176075	Ppargc1b	PGC1beta, Perc (<i>Coactivador 1-β del PPAR-γ</i>)
NM_017045	Rb1	(<i>Proteína Retinoblastoma 1</i>)
NM_144741	Retn	(<i>Resistina</i>)
NM_001108657	Runx1t1	Cbfa2t1(<i>Proteína asociada a ciclina D1</i>)
NM_012805	Rxra	(<i>Receptor X de retinoides</i>)
NM_001276712	Sfrp1	sFRP-1 (<i>Proteína de secreción asociada a frizzled 1</i>)
NM_001107591	Sfrp5	(<i>Proteína de secreción asociada a frizzled 5</i>)
NM_017221	Shh	(<i>Sonic hedgehog</i>)
NM_001107627	Sirt1	Sir1(<i>Sirtuina1</i>)
NM_001008368	Sirt2	(<i>Sirtuina 2</i>)
NM_001106313	Sirt3	(<i>Sirtuin 3</i>)
NM_012751	Slc2a4	Glut4(<i>Miembro 4 de la familia 2 de acarreadores de soluto, transportador de glucosa</i>)
NM_031977	Src	(<i>Homologo al oncogen viral de Sarcoma V-src Schmidt-Ruppin A-2</i>)
NM_001276707	Srebf1	ADD-1, ADD1, SREBP-1, SREBP-1c, Srebp1(<i>SREBP 1</i>)
NM_017064	Stat5a	Stat5(<i>Transductor de señal y activador de la transcripción 5A</i>)
NM_001025748	Taz	(<i>Tafazzina</i>)
NM_001191052	Tcf7l2	(<i>Proteína similar al factor de transcripción 7 número2</i>)
NM_031345	Tsc22d3	Dsipi, Gilz (<i>Miembro 3 de la familia del dominio TSC22</i>)
NM_053530	Twist1	Twist (<i>Homologo a Twist 1 de Drosophila</i>)
NM_012682	Ucp1	Ucp, Ucpa, Uncp (<i>Proteína desacoplante 1, acarreador mitocondrial de protones</i>)
NM_017058	Vdr	Nr1i1 (<i>Receptor de 1,25- dihidroxivitamina D3</i>)
NM_001105714	Wnt1	Int1 (<i>Miembro 1 de la familia del sitio de integración Wingless-type MMTV</i>)
NM_001108111	Wnt10b	(<i>Miembro 10B de la familia del sitio de integración Wingless-type MMTV</i>)
NM_001107005	Wnt3a	(<i>Miembro 3A de la familia del sitio de integración Wingless-type MMTV</i>)
NM_022631	Wnt5a	(<i>Miembro 5B de la familia del sitio de integración Wingless-type MMTV</i>)
NM_001100489	Wnt5b	(<i>Miembro 5A de la familia del sitio de integración Wingless-type MMTV</i>)

Los niveles de expresión génica se determinaron mediante la cuantificación relativa de los mRNA correspondientes a 84 genes asociados a la expansión del tejido adiposo, antes mencionados (Tabla 3) cuya expresión se analizó en un recurso informático basado en la red (Qiagen Data Analysis Center, www.qiagen.com/mx/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/).

Los genes con expresiones mayores a 1.8 o menores a -1.8 veces de cambio vs C y con $p < 0.05$ se consideraron como diferencialmente expresados, de acuerdo a

diversos análisis transcriptómicos reportados en trabajos previos usando modelos de obesidad materna similares al del presente estudio (Borengasser et al., 2013; Lomas-Soria et al., 2018). La asociación funcional de los genes diferencialmente expresados fue obtenida de la base de datos STRING a la página web <http://string-db.org> (Szklarczyk et al., 2019). El punto de corte para el nivel de confianza fue de 0.8, el cual representa la probabilidad mínima de la asociación génica de acuerdo a las evidencias empíricas encontradas en dicha base datos al momento del análisis.

ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN ESTROMAL VASCULAR DE LOS DESCENDIENTES F1

Aislamiento de la Fracción Estromal Vasculuar

La Fracción Estromal Vasculuar (FEV) de tejido adiposo de rata se extrajo a partir de muestras ≥ 7.0 g de tejido adiposo retroperitoneal fresco, extraído al momento del de animales de 350 días de edad, los cuales son un poco más grandes y acumulan una cantidad suficiente de tejido adiposo retroperitoneal para obtener un rendimiento óptimo. Cada muestra de tejido adiposo retroperitoneal fue seccionada finamente con tijeras de disección estériles hasta obtener únicamente fragmentos de 2-3 mm de espesor. La muestra seccionada se incubó a 37° C con 3.5 mL de medio de digestión por cada gramo de tejido, empleado. Se incubó durante 60 min en un agitador orbital a velocidad constante de 200 revoluciones por minuto (RPM). El medio de digestión consistió en solución salina amortiguadora de fosfatos PBS (0.05 M de pH=7.4), suplementado con glucosa (5.0 mM), albúmina (1.5 %) y colágenasa tipo I de GIBCO Life Technologies (3.5 mg/mL).

Transcurrido el tiempo de digestión, la mezcla fue filtrada a través de una gasa estéril. La fracción filtrada, fue centrifugada a una fuerza relativa de 200xG a temperatura ambiente por 10 min. La digestión de la muestra se detuvo se descartando el sobrenadante y re-suspendiendo el pellet obtenido con un volumen equivalente al descartado de solución de Hanks (Hanks' Balanced Salt Solution de Gibco®, 14025-092) suplementado con suero fetal bovino al 10% estéril,

manteniendo las células a 4°C; posteriormente se realizó un segundo lavado con solución amortiguadora de lisis para eritrocitos (RBC por sus siglas en inglés), que consistió en una solución de NH₄Cl (16 mM), EDTA (1.3 mM) y NaHCO₃ (10 mM) ajustada a un pH=7.4 con HCl; la mezcla obtenida fue centrifugada por segunda vez a 200xG por 10 min a 4°, el sobrenadante fue substituido por solución amortiguadora de lisis para eritrocitos en las mismas condiciones del paso anterior. Finalmente, el pellet obtenido se resuspendió en 1 mL de solución amortiguadora RBC.

El conteo de células y análisis de viabilidad se realizó diluyendo una alícuota de la suspensión, obtenida en proceso previamente descrito, con solución amortiguadora salino de fosfatos (PBS por sus siglas en inglés) 0.05M de pH=7.4 en una proporción 1:6, suplementando con azul de tripano a una concentración final de 0.07 %. La mezcla se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó el conteo de las células obtenidas en la FEV usando una cámara de Neubauber, identificando a las células viables (no teñidas) y no viables (coloreadas).

Análisis de la expresión de genes adipogénicos en la fracción estromal vascular

Para llevar a cabo este análisis, se estandarizaron las condiciones óptimas para el aislamiento de la FEV que permitiera una extracción de RNA con calidad adecuada para los análisis de expresión en un arreglo de RT-PCR. De acuerdo a la estandarización llevada a cabo en el presente trabajo, se usaron muestras de al menos 1×10⁶ células/mL con viabilidad mayor al 70%, a las cuales inmediatamente después de su obtención se les añadió 1mL de Trizol (TRIZOL™ Reagent Invitrogen™ 15596026) y almacenó a -70° C hasta su procesamiento posterior.

Una vez recolectadas todas las muestras, se llevó a cabo la extracción de RNA de acuerdo a las instrucciones del fabricante establecidas para células de cultivo celular en medio líquido. Las muestras de RNA obtenidas, se analizaron

espectrofotométricamente (BioDrop μ LITE, 80-3006-51), determinando la absorbancia (Abs) a las longitudes de onda de 230, 260 y 280 nm. Los valores de $Abs_{260}/Abs_{230} = 2.1 \pm 0.1$ y $Abs_{260}/Abs_{230} = 2.0 \pm 0.2$ fueron utilizados como criterios de calidad para RT-PCR.

A partir de las muestras RNA con la calidad suficiente para RT-PCR, se sintetizó el DNA complementario (cDNA) utilizando un estuche comercial (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis, Roche 04897030001), en un termociclador (Veriti™ 96-Well Thermal Cycler de Applied Biosystems) programado de acuerdo al protocolo del fabricante del estuche. La cantidad relativa del cDNA obtenido se determinó mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR por sus siglas en inglés) en el sistema de análisis (LightCycler® 2.0 de Roche) para cuantificar la cantidad relativa de los transcritos correspondientes a los genes PPAR- γ y CEBP- α .

RESULTADOS

METABOLISMO DE LAS HEMBRAS EXPERIMENTALES F0

Peso corporal materno antes de aparear

En las hembras experimentales F0, antes de aparear, se observó mayor ganancia de peso en el grupo OM respecto al C ($P < 0.05$) a partir del día 84 (Fig. 8).

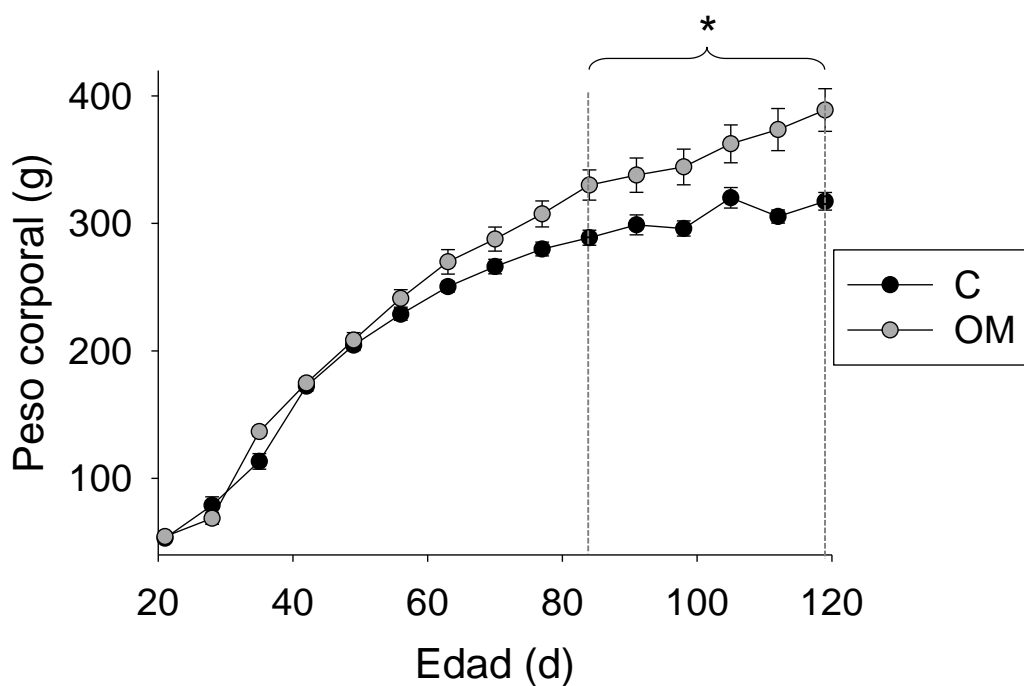


Figura 8. Curva de crecimiento materno antes de aparear. Peso corporal de las hembras experimentales F0 antes de aparear (21 - 120d de edad). Media \pm EE, n=8 hembras por grupo. * ($P < 0.05$) vs. C.

Peso corporal materno durante la gestación y lactancia

El peso corporal del grupo OM fue mayor respecto al C a lo largo de toda la gestación. Determinándose una ganancia de peso en forma gradual desde el día 0 hasta el día 14, correspondiente a un incremento del 17% dentro del grupo C y OM. Posteriormente, se detectó una ganancia de peso acelerada, de los 14 a los 19 días de lactancia observándose que durante este periodo, la ganancia relativa de peso corporal fue de 9% en el grupo OM, la cual fue menor en comparación a la ganancia relativa de peso corporal que fue de 15% en el grupo C (Fig. 9). Respecto a la lactancia, peso en el grupo OM fue mayor en comparación con el grupo C, durante los primeros 8 días de la lactancia. A partir del día 9 de y hasta el día 21 el peso corporal materno en ambos grupos fue similar (Fig. 9).

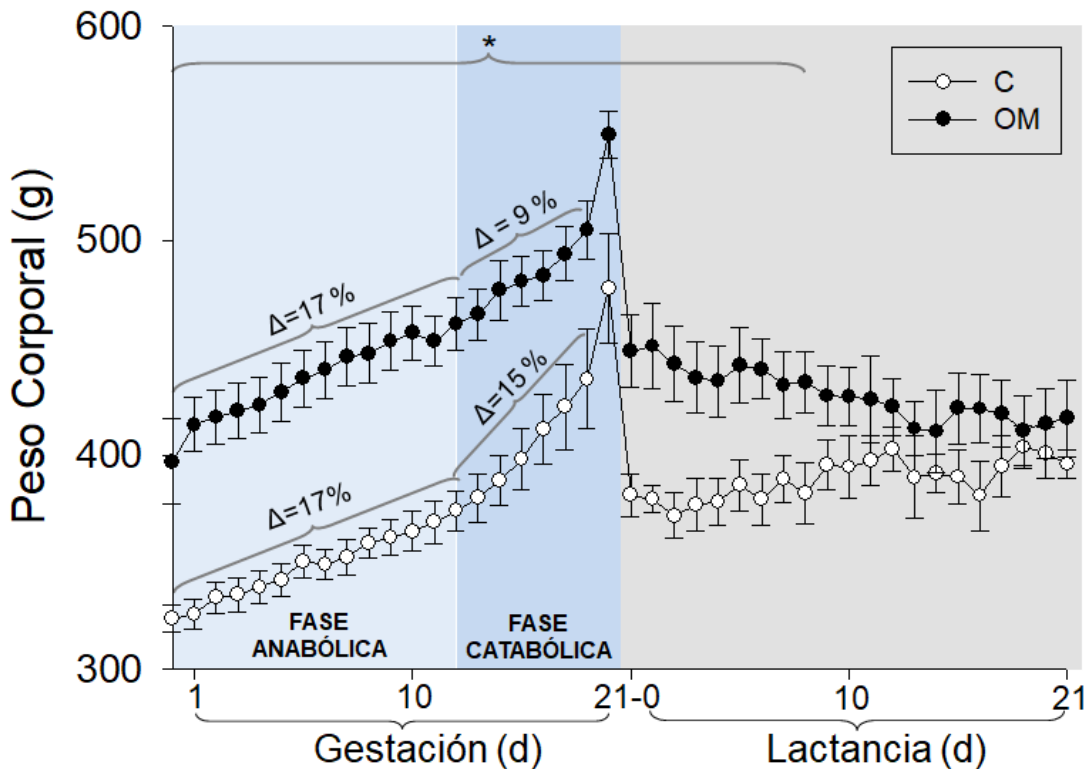


Figura 9. Peso corporal materno durante la gestación y lactancia. Peso corporal materno medido diariamente durante la gestación y lactancia de las madres del grupo C y madres del grupo MO. Media \pm EE, n=8, * (P<0.05) vs. C.

Parámetros metabólicos maternos (F0) al final de la lactancia

Al final de la lactancia las madres (hembras F0) del grupo OM presentaron concentraciones más elevadas glucosa y mayor IRI respecto al C, sin detectarse cambios significativos en las concentraciones de insulina (Fig. 10).

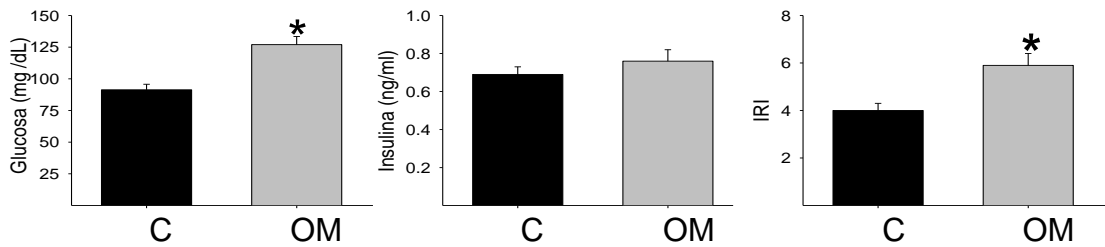


Figura 10. Metabolismo materno de glucosa al final de la lactancia. Se muestra la concentración sanguínea de glucosa e insulina así como el índice de resistencia a la insulina (IRI= Glucosa (en mmol/L)*Insulina (en μ U/mL)/22.5) maternos (F0) al final de la lactancia (aprox. a los 142 d de edad). Media \pm EE, n=8 hembras por grupo, * (P<0.05) vs. C.

Respecto a la concentración en suero de leptina y triglicéridos, estas se encontraron elevadas en el grupo OM respecto a C; así mismo se el IA fue mayor en OM vs. C (Fig. 11)

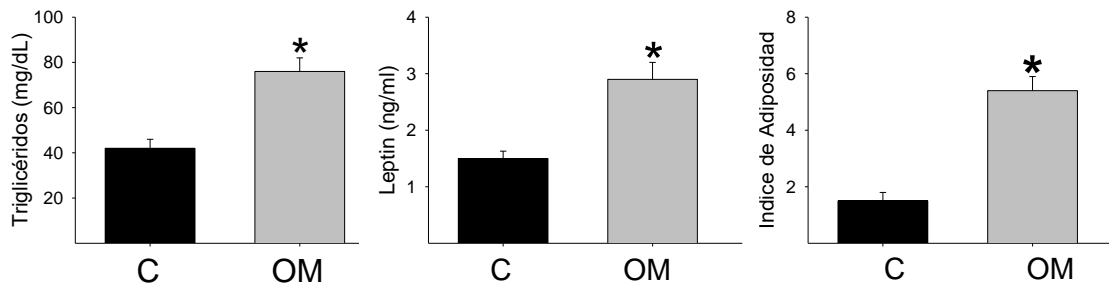


Figura 11. Metabolismo materno de lípidos al final de la lactancia. Se muestra la concentración sanguínea de triglicéridos y leptina, así como el índice de adiposidad (IA=grasa visceral*100/peso corporal) maternos (F0) al final de la lactancia (aproximadamente a los 142 d de edad). Media \pm EE, n=8 hembras por grupo, * (P<0.05) vs. C.

METABOLISMO DE LOS DESCENDIENTES F1

Peso corporal, al nacimiento y al final de la lactancia.

En las crías, al nacimiento, el peso corporal en los machos del grupo OM fue menor respecto al C, mientras que en las hembras no se detectaron diferencias significativas entre los grupos C y OM. Respecto al final de la lactancia, el peso corporal fue mayor en los machos OM, mientras que en las hembras el peso corporal fue similar entre los grupos C y OM (Tabla 4).

Tabla 4. Peso corporal al nacimiento y al final de la lactancia de F1. Se muestran los datos correspondientes a las crías hembra y macho (F1) al nacimiento y al final de la lactancia.

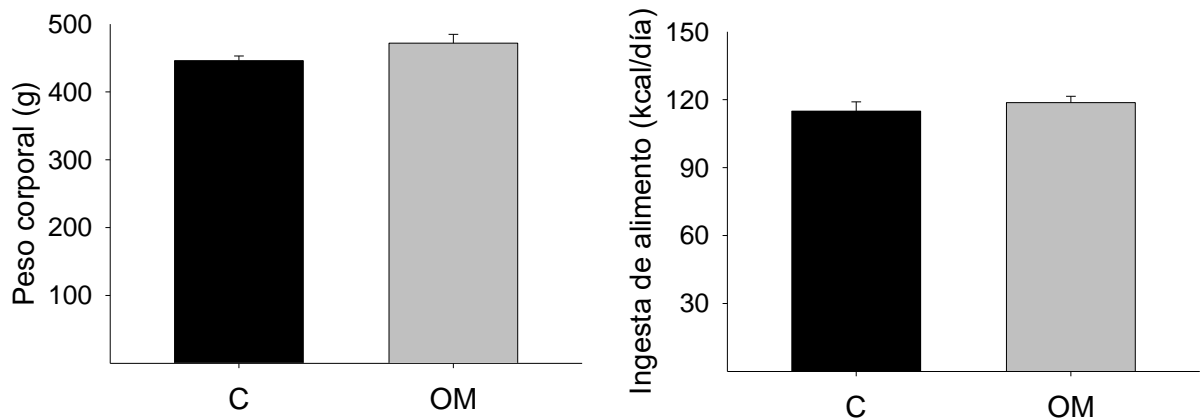
Edad	Machos		Hembras	
	C	OM	C	OM
0 d (al nacimiento)	7.0 ± 0.1 g	6.6 ± 0.1* g	6.7 ± 0.1 g	6.4 ± 0.1 g
21 d (al final de la lactancia)	72.5 ± 5.3 g	73.9 ± 0.3g	64.5 ± 1.3 g	79.3 ± 0.2 g

Se representa la Media ± EE del valor obtenido de las hembras y machos de cada camada, n=8 camadas, * (P<0.05).

Peso e ingesta de alimento a los 110 d.

En los descendientes a los 110d, correspondientes a la edad de adulto joven, no hubo diferencias significativas en el peso corporal ni en la ingesta promedio determinada de los 100 a los 110d entre los grupos C y OM en machos ni en hembras (Fig. 12).

Machos



Hembras

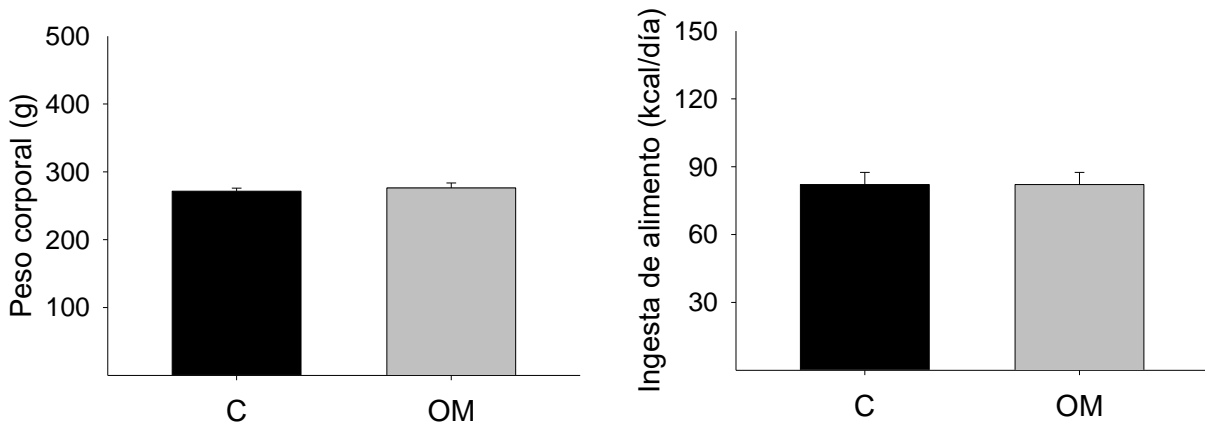
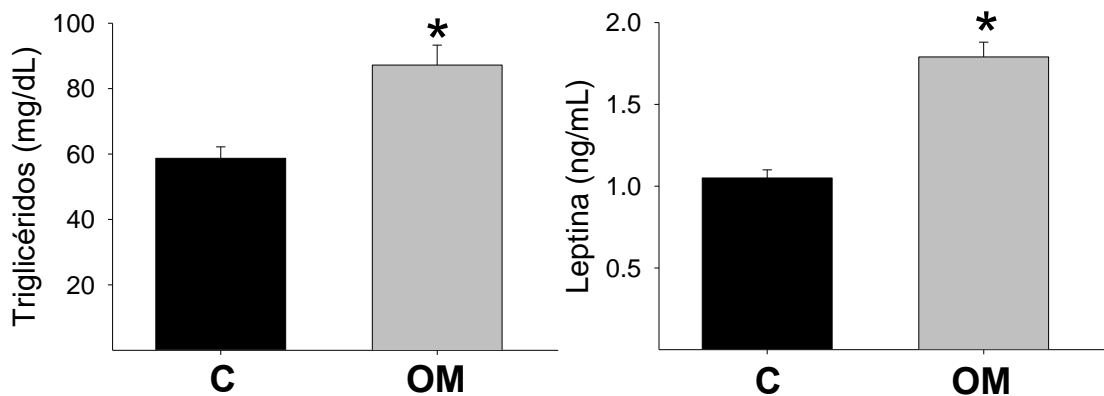


Figura 12. Peso corporal e ingesta de alimento de los descendientes. Se muestra el peso corporal y la ingesta de alimento en hembras y machos (F1). Media \pm EE, n=8, * (P<0.05) vs. C.

Parámetros metabólicos de los descendientes F1

Las concentraciones en suero de triglicéridos y leptina en los machos F1 del grupo OM fueron mayores con respecto a C. Para las hembras sólo fueron mayores los triglicéridos en OM vs C, pero no se detectaron diferencias significativas en las concentraciones de leptina (Fig. 13).

Machos



Hembras

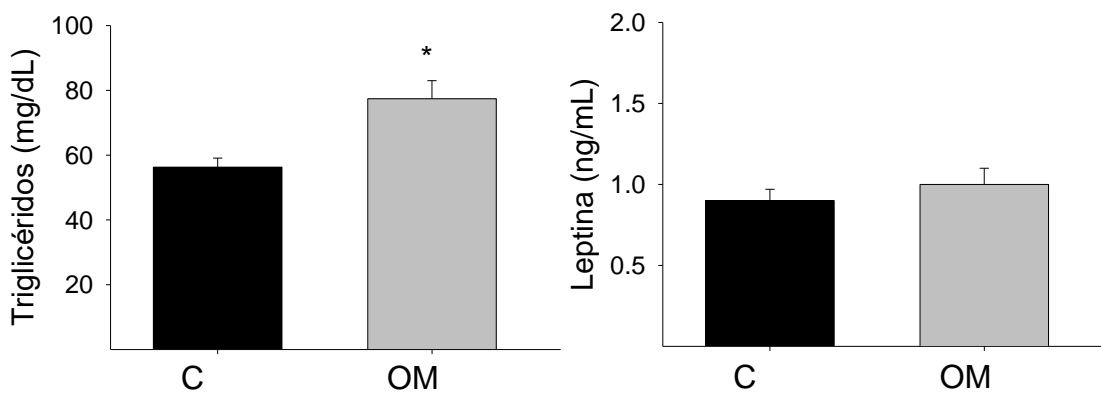


Figura 13. Metabolismo de lípidos en los descendientes F1. Se muestra la concentración de triglicéridos y leptina de la crías (F1) macho, Media \pm EE, n=8, *(P<0.05) vs C.

Respecto a la concentración de glucosa, los valores obtenidos fueron similares entre los grupos C y OM, sin embargo se obtuvieron concentraciones elevadas de insulina y valores elevados de IRI en el caso de las crías OM. De igual forma, en las hembras, las concentraciones de glucosa fueron similares entre los grupos C y OM; sin embargo, se obtuvieron concentraciones elevadas de insulina y valores elevados de IRI en el caso de las crías OM (Fig.14).

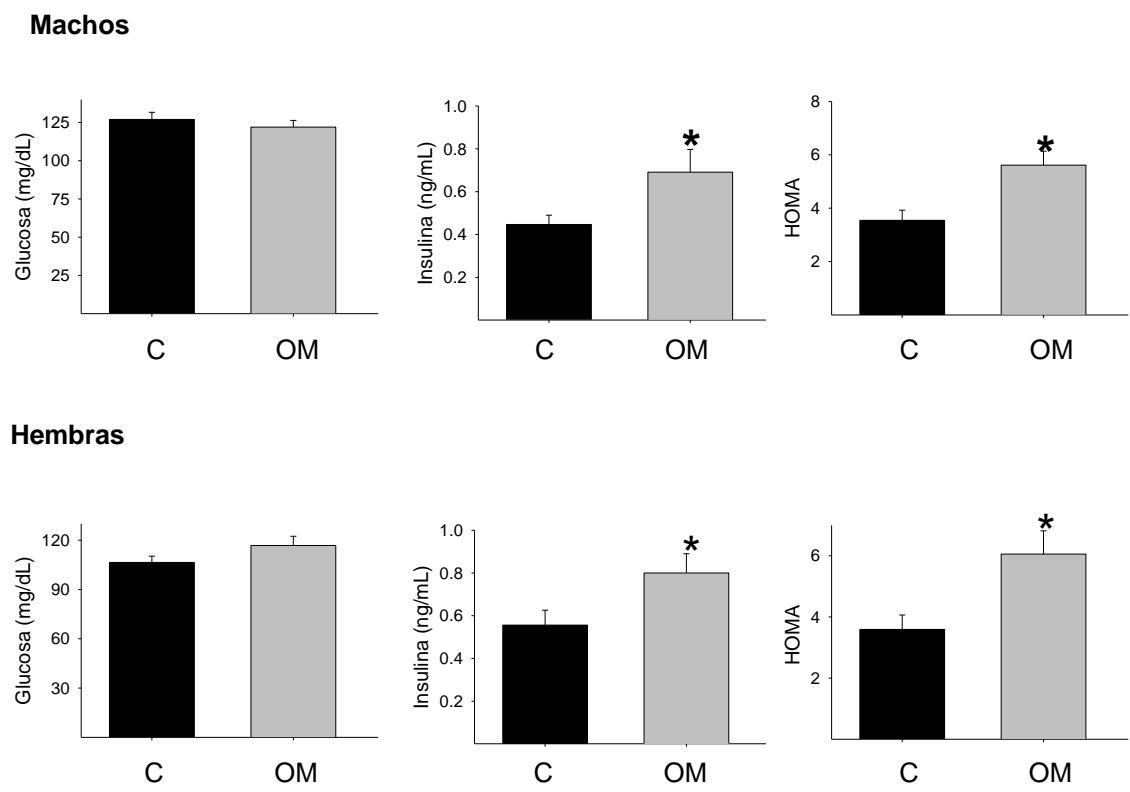


Figura 14. Metabolismo de glucosa en los descendientes F1. Se muestra la concentración sanguínea de glucosa, insulina y el índice de resistencia a la insulina ($HOMA = \frac{Glucosa(mM) * Insulina (\mu U/mL)}{22.5}$) en crías (F1) macho Media \pm EE, n=8, *(P<0.05) vs C.

COMPOSICION CORPORAL DE LOS DESCENDIENTES F1

Adiposidad de los descendientes F1 a los 110 d.

Tanto en machos como en hembras de los grupos C y OM, se llevó a cabo el análisis de la composición corporal mediante MRI, en el que los machos del grupo C y OM presentaron cantidades similares de masa grasa, mientras que en las hembras se observó mayor cantidad de masa grasa en el grupo OM en comparación con el C (Fig. 15).. En el análisis de la composición corporal por DXA (Fig. 16), en los machos del grupo OM se determinó mayor contenido de grasa corporal respecto al C. Respecto a la determinación del índice de adiposidad, tanto machos como hembras mostraron mayor cantidad de tejido adiposo al momento de la necropsia

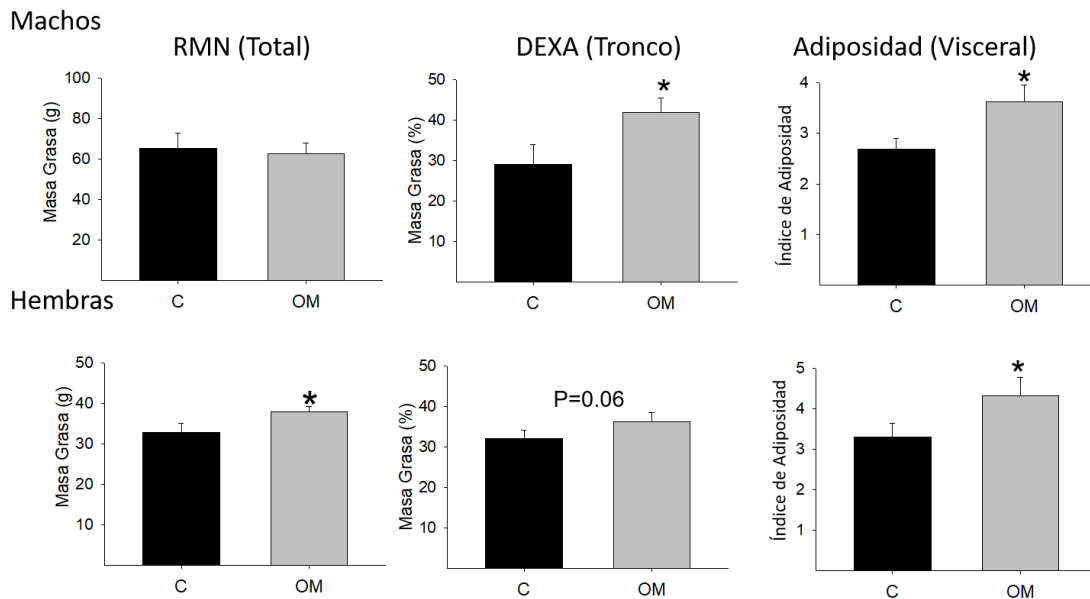


Figura 15. Adiposidad de los descendientes. Se muestra el contenido de masa grasa total y masa grasa del tronco en % así como el índice de adiposidad en hembras y machos (F1). Media ± EE, n=8, * (P<0.05) vs. C.

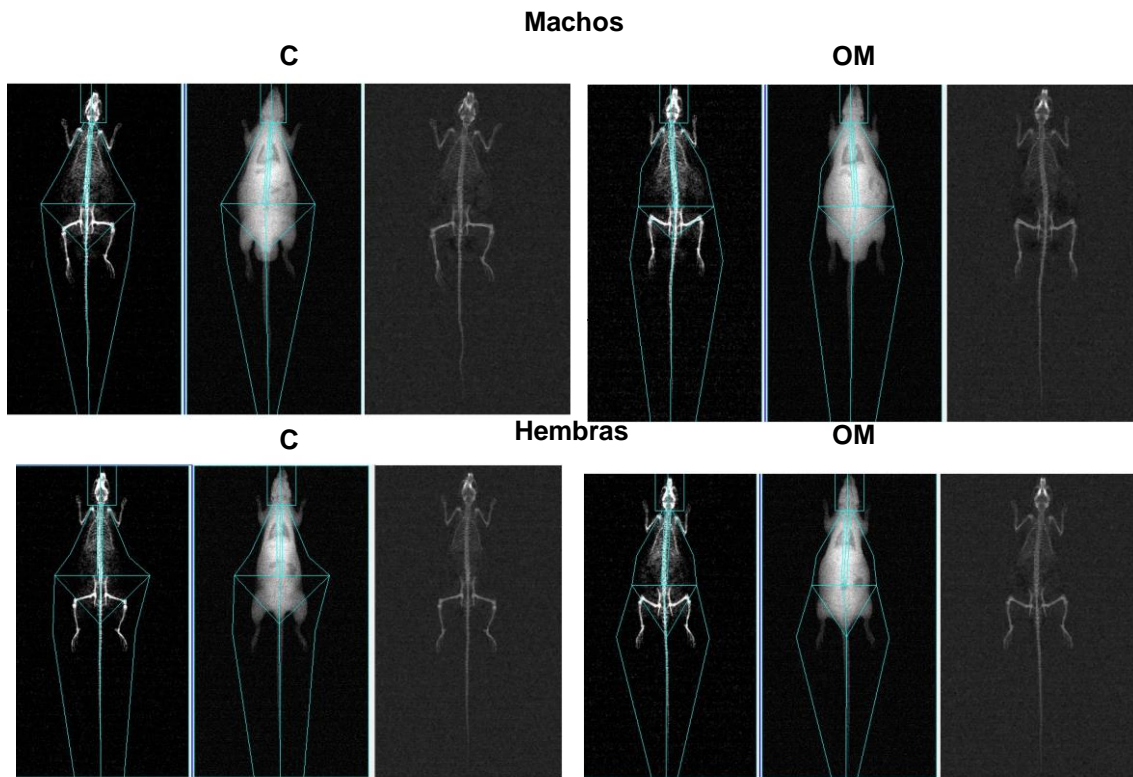


Figura 16. Análisis de la composición corporal por DXA en F1. Imágenes representativas obtenidas por absorciometría dual de rayos (DXA por sus siglas en inglés). De izquierda a derecha se muestra la imagen a partir de la que se realizó la determinación del % masa grasa.

TEJIDO ADIPOSO DE LOS DESCENDIENTES F1

Análisis histológico del tejido adiposo

A los 110 d se analizó el tamaño del adipocito en cortes histológicos, determinándose mayor área en los descendientes de madres obesas respecto al grupo control, tanto en machos como en hembras (Fig. 17).

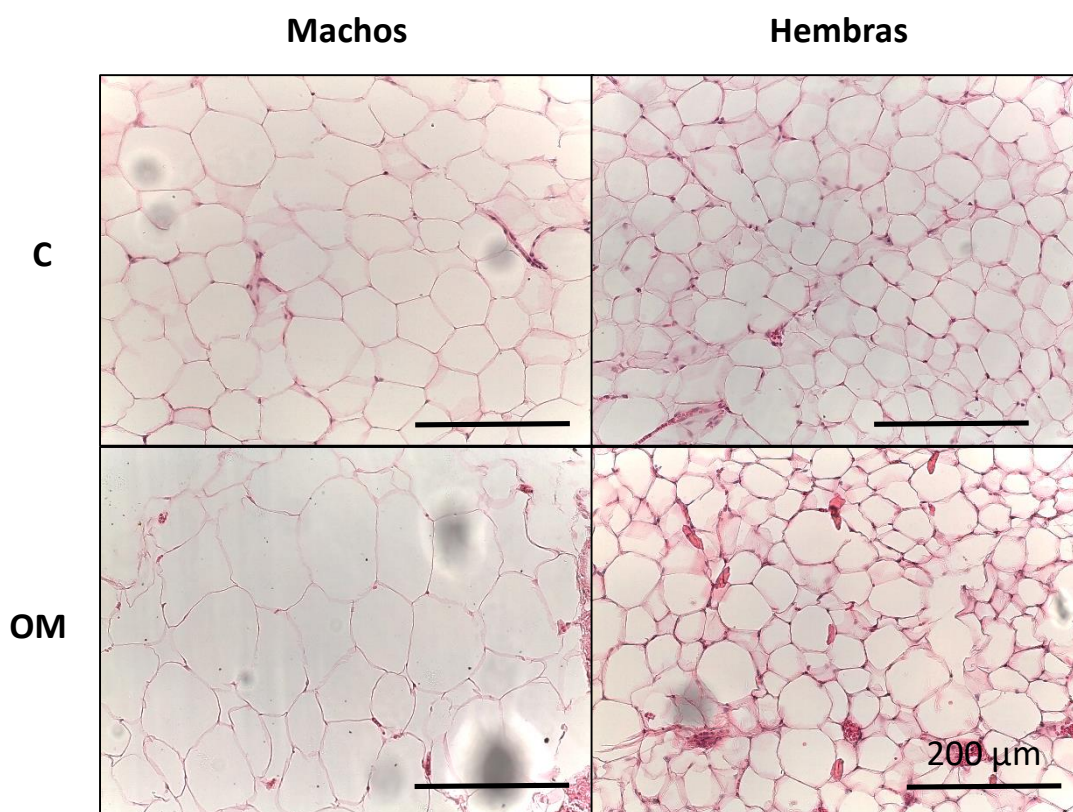


Figura 17. Tejido adiposo retroperitoneal de las crías F1. Cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina, 20 X.

Caracterización de la distribución del tamaño del adipocito

En este experimento se observó que independientemente del sexo o grupo experimental, la distribución del tamaño del adipocito es muy heterogénea (Fig. 18 A y D). Los machos y hembras F1 del grupo OM mostraron mayor tamaño del adipocito en cuanto a la media y mediana (Fig. 18 B y E). Además se detectaron diferencias significativas en cuanto a la comparación de las distribuciones acumuladas, lo que demuestra que la distribución de tamaños del grupo C y del grupo OM son diferentes en hembras y machos, no solo en términos del tamaño medio del adipocito, ya que en dicha comparación se comparan los adipocitos de tamaño extremo (Fig. 18 C y F).

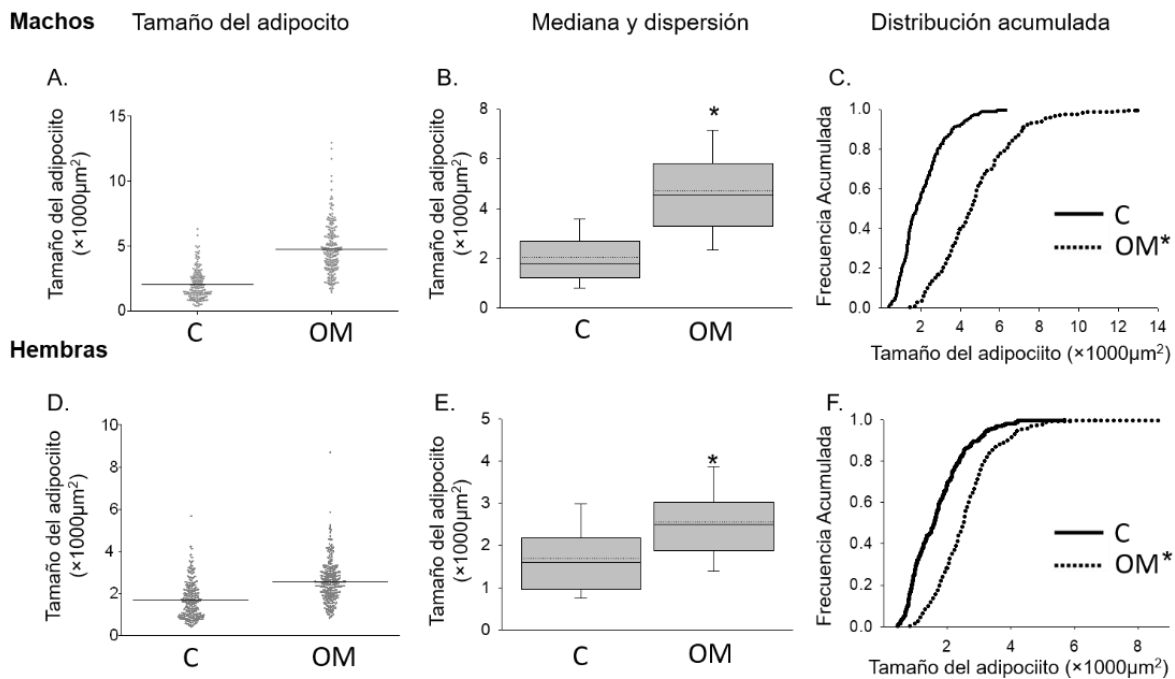


Figura 18. Caracterización del tamaño del adipocito en las crías F1. A y D Tamaño del adipocito, B y E Mediana y rango intercuartílico con percentiles 5 y 95 como barras de error, C y F Comparación de distribuciones acumuladas, * ($P < 0.05$) vs. C.

Asimismo, se observó mayor dispersión en los descendientes OM vs. C.

No obstante, la dispersión de tamaños fue mayor en los machos OM respecto a C (Fig. 19).

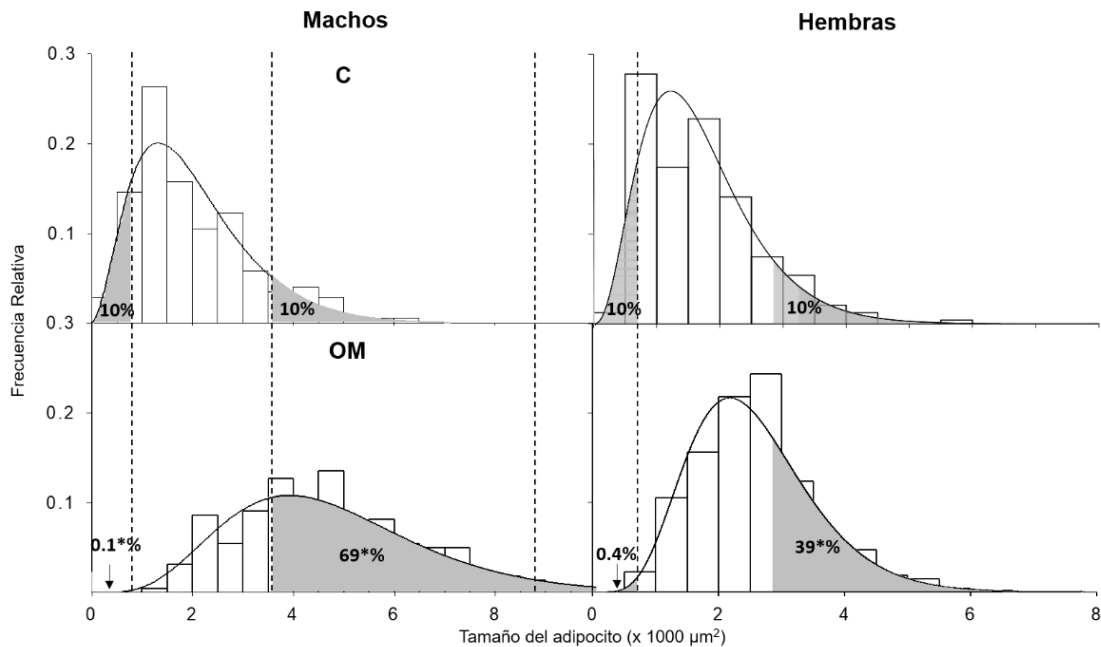


Figura 19. Distribución de tamaño del adipocito en F1. Se muestra el histograma de frecuencias ajustado a la distribución gamma para las crías (F1) C y OM a los 110 d. Las áreas sombreadas corresponden a la proporción de adipocitos pequeños y grandes, las cuales fueron determinadas usando el primer y último decil de cada grupo C. En los machos y hembras del grupo OM se observó que la proporción de adipocitos pequeños se redujo y la proporción de adipocitos grandes aumentó.* ($P > 0.05$) vs. C.

Respecto a la proporción de adipocitos pequeños en cada grupo experimental, ésta se redujo drásticamente en machos y en hembras del grupo OM. Mientras que la proporción de adipocitos grandes aumentó en machos y en hembras del grupo OM, cabe señalar que dicho aumento fue más exacerbado en los machos que en las hembras del grupo MO (Tabla 5).

Tabla 5. Proporción de adipocitos grandes y pequeños en F1. Se muestran los datos correspondientes a la distribución gamma, * (P<0.05) vs. C..

Grupo experimental	Machos		Hembras	
	Adipocitos Pequeños ($\leq 750 \mu\text{m}^2$)	Adipocitos Grandes ($\geq 3500 \mu\text{m}^2$)	Adipocitos Pequeños ($\leq 600 \mu\text{m}^2$)	Adipocitos Grandes ($\geq 2700 \mu\text{m}^2$)
C	10%	10%	10%	10%
OM	0.1%*	69%*	0.4%*	39%*

EXPRESIÓN GÉNICA EN EL TEJIDO ADIPOSO DE LOS DESCENDIENTES F1.

Al comparar la expresión normalizada en el arreglo de genes entre el grupo OM vs C en los machos, se observó que la mayor parte (63%) de los genes analizados tenía una expresión disminuida, mientras que en las hembras se observó un incremento respecto al C en la expresión de algunos (20%) de los genes analizados (Fig.20).

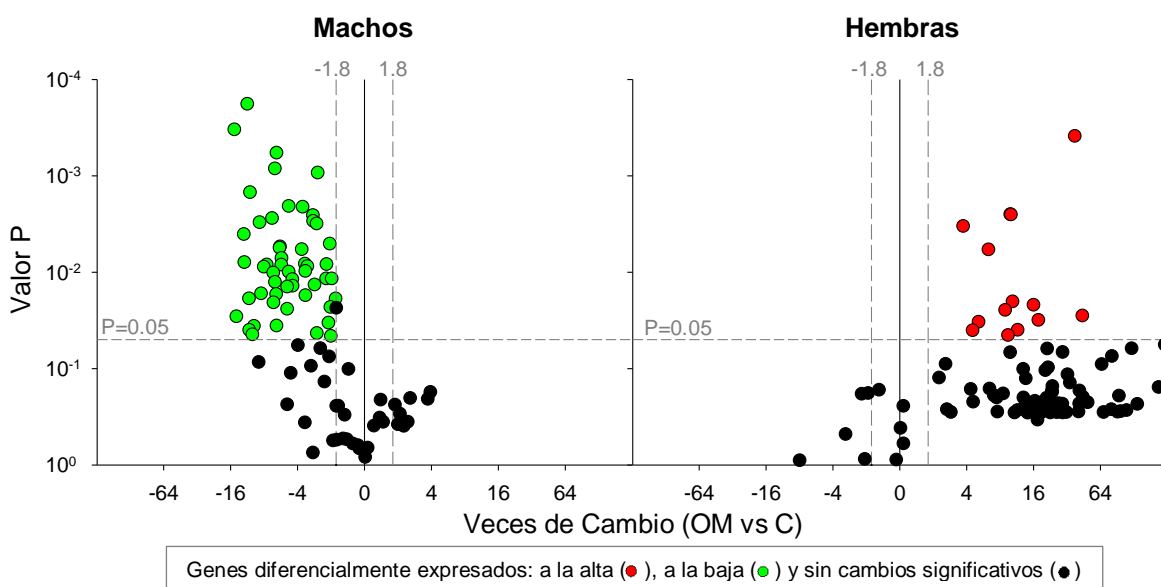


Figura 20. Expresión génica en el tejido adiposo en machos y hembras F1. Se muestra la significancia estadística y la expresión del grupo OM respecto a C, correspondientes a los 84 genes analizados (RT2-Profiler-Array Rat Adipogenesis, Qiagen). La expresión diferencial se consideró a partir de ± 1.8 veces de cambio y $P < 0.05$.

La asociación funcional entre los genes diferencialmente expresados en machos (Tabla 6) y en hembras (Tabla 7) se visualizó mediante la búsqueda de

interacciones conocidas en la base datos STRING 10 (Jensen et al., 2009). En los machos OM, se observaron asociaciones funcionales entre los genes pertenecientes a la vía de señalización WNT, de los receptores nucleares y de las proteínas reguladoras del ciclo celular. En las hembras las asociaciones funcionales se encontraron en la expresión de proteínas relacionadas a la vía de las MAPK (Fig. 21).

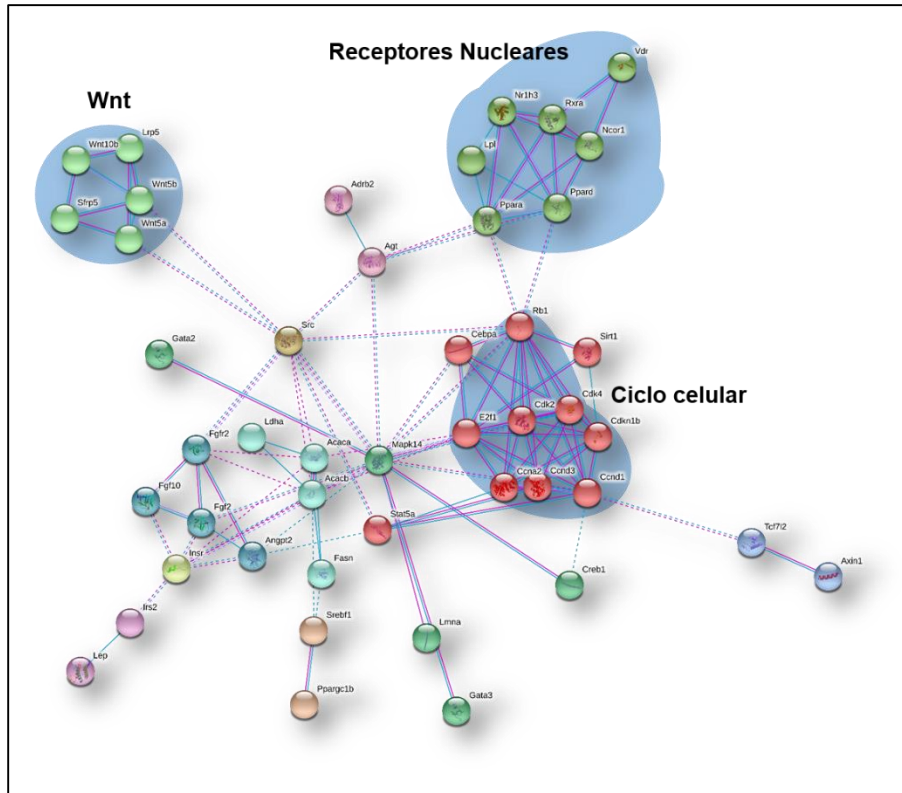
Tabla 6. Expresión génica y su asociación funcional en los machos OM F1

Asociación Funcional	Gen	Expresión OM vs. C (Veces de cambio)	Valor P
Vía WNT	Lrp5. Proteína asociada al receptor de LDL 5	-10.7	0.002
	Sfrp5. Proteína de secreción asociada a Frizzled 1	-8.1	0.01
	Wnt5a. Miembro 5A de la familia Wnt	-6.6	0.01
	Wnt5b. Miembro 5B de la familia Wnt	-10.9	0.02
	Wnt10b. Miembro 10B de la familia Wnt	-10.9	0.04
Receptores nucleares	Nr1h3. Receptor nuclear de oxisteroles LXR α	-6.4	0.001
	Rxra. Receptor X de retinoides	-2.7	0.003
	Ppara. PPAR- α	-2.9	0.003
	Ncor1. Corepresor de receptores nucleares 2	-2.9	0.003
	Vdr. Receptor de 1,25-dihidroxitamina D3	-5.8	0.005
	Ppard. PPAR- δ	-5.8	0.006
	Lpl. Lipasa de lipoproteínas	-2.7	0.04
Ciclo Celular	Cebpa. CEBP- α	-3.6	0.002
	Stat5a. Transductor de señal y activador transcripcional 5A	-8.8	0.003
	Cdk4. Cinasa dependiente de ciclina 4	-2.1	0.005
	Ccnd1. Ciclina D1	-7.6	0.01
	Cdkn1b. . Inhibidor 1A de cinasa dependiente de ciclina	-8.5	0.02
	Sirt1. Sirtuina1	-1.8	0.02
	Rb1. Proteína Retinoblastoma 1	-1.8	0.02
E2f1. Factor de transcripción a E2F 1	-6.2	0.04	

Tabla 7. Expresión génica y su asociación funcional en las hembras OM F1

Asociación Funcional	Gen Descripción	Expresión OM vs. C Veces de cambio	Valor P
Vía MAPK	Jun. Oncogen Jun	37.5	0.0004
	Creb1. Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc 1	6.3	0.006
	Mapk14. Proteína quinasa activada por mitogenos 14	10.0	0.003
	Ddit3. Transcrito 3 inducible por daño al DNA	9.9	0.003
	Lmna. Lamina A	5.1	0.03

Machos



Hembras

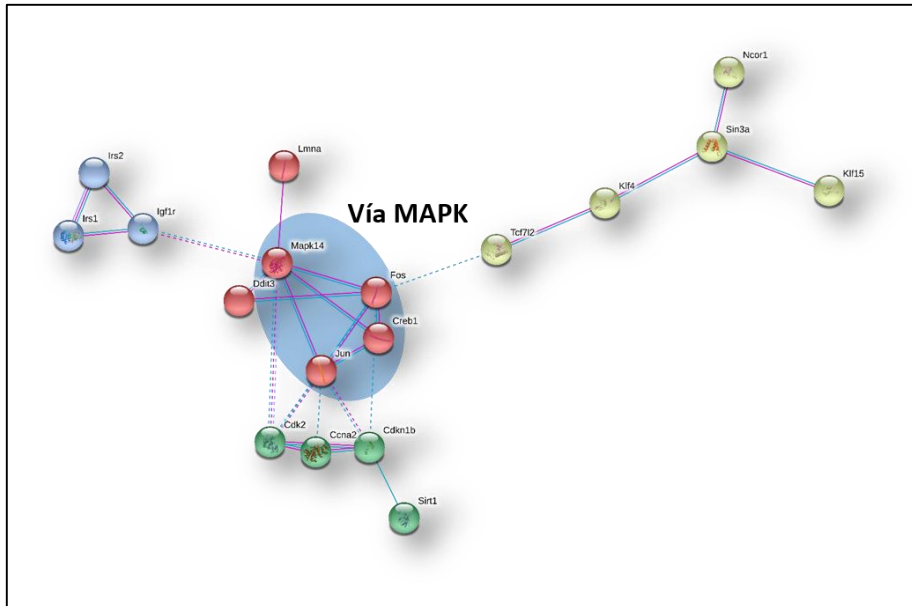


Figura 21. Asociación de genes diferencialmente expresados en F1. La asociación funcional de los genes se visualizó mediante la búsqueda de interacciones conocidas en la base datos STRING V.10 <https://version-10-5.string-db.org/>.

EXPRESIÓN GÉNICA EN LA FRACCIÓN ESTROMAL VASCULAR DE LOS DESCENDIENTES F1

Para analizar el carácter adipogénico de la fracción estromal vascular (FEV) se determinó la expresión de los genes PPAR γ y CEBP α , como biomarcadores de la fase de compromiso de los preadipocitos. Respecto a la expresión de los genes maestros de la adipogénesis, en los machos OM el gen PPAR γ se encontró expresado en mayor proporción, mientras que el CEBP α se encontró expresado en menor proporción respecto a C (Fig.22).

Machos

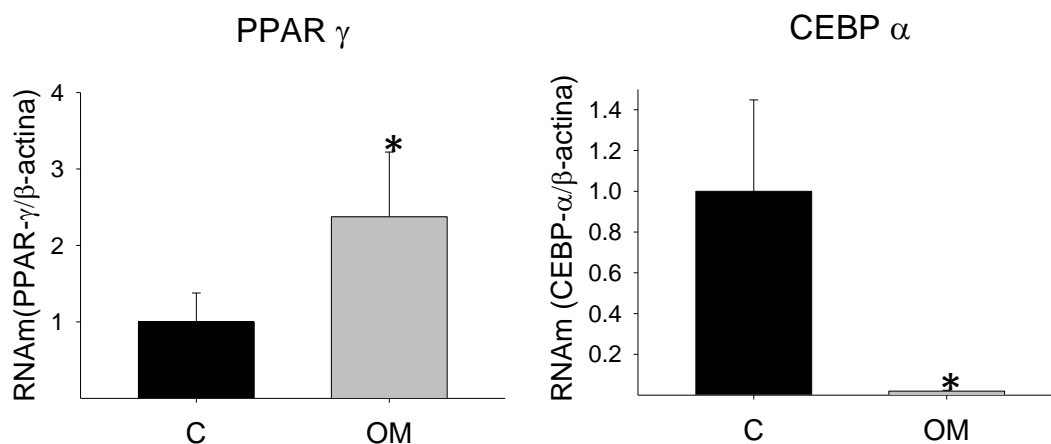


Figura 22. Adipogénesis en la Fracción Estromal Vascular de los machos F1. Las muestras se extrajeron del tejido adiposo retroperitoneal. Se muestra la concentración relativa del mRNA de los genes PPAR- γ , y CEBP- α , como genes maestros de la adipogénesis.

Respecto a la expresión de los genes maestros de la adipogénesis en las hembras, en el grupo OM, los genes PPAR γ y CEBP- α se encontraron expresados en mayor proporción respecto a C (Fig.23).

Hembras

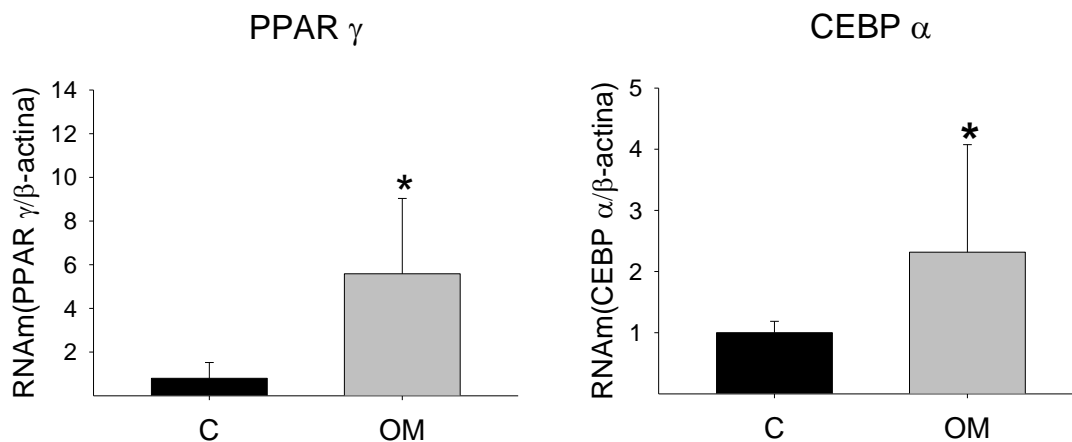


Figura 23. Adipogénesis en la Fracción Estromal Vascular de hembras F1. Las muestras se extrajeron del tejido adiposo retroperitoneal, Se muestra la expresión relativa del mRNA de los genes PPAR- γ , y CEBP- α . como genes maestros de la adipogénesis

DISCUSIÓN

EFFECTOS INTERGENERACIONALES DE LA OBESIDAD MATERNA

El presente trabajo se enfocó en los efectos intergeneracionales de la obesidad materna durante la fase de crecimiento previa a la gestación, durante la gestación y la lactancia. El modelo experimental descrito, se caracterizó por el control estricto de la homogeneidad de las condiciones fisiológicas de la generación de progenitores que dieron origen a la generación materna F0. Por lo tanto, los efectos fisiológicos programados en los descendientes de madres obesas pueden ser considerados únicamente intergeneracionales.

Así mismo, el modelo animal empleado permitió analizar los efectos de la dieta alta en grasa en hembras genéticamente similares, ya que los grupos experimentales se formaron mediante la distribución de pares de hembras provenientes de la misma camada (hermanas F0) entre los grupos C y OM. De esta forma se descartó al máximo posible el hallazgo de diferencias fenotípicas en los descendientes atribuibles al genotipo materno.

Por otra parte, al ajustar el tamaño de las camadas experimentales, igualando a 10 la cantidad de crías F1 alimentadas por cada hembra F0 durante la lactancia, redujo al máximo posible las influencias debidas a diferencias en la cantidad de alimento ingerido por las crías F1 durante la lactancia (Bieswal et al., 2006; Engelbregt, van Weissenbruch, Popp-Snijders, Lips, & Delemarre-van de Waal, 2001). Por lo tanto el fenotipo observado en los descendientes de madres obesas puede ser considerado como un efecto únicamente programado por el estado nutricional materno y el metabolismo materno asociado a la dieta alta en grasa.

En estudios previos, realizados dentro de nuestro grupo de trabajo (Bautista et al., 2017; Lomas-Soria et al., 2018; Rodriguez-Gonzalez et al., 2015; Rodriguez et al., 2012; Santos et al., 2015; E. Zambrano, Ibáñez, et al., 2016; E. Zambrano, Martinez-Samayoá, Rodriguez-Gonzalez, & Nathanielsz, 2010; E. Zambrano, Sosa-Larios, et

al., 2016); se ha demostrado que la alimentación de hembras experimentales F0 con dieta alta en grasa en grasa administrada desde el destete y durante la gestación y lactancia, conduce al incremento en el peso corporal, acumulación excesiva de grasa corporal y alteraciones metabólicas como la hipetrigliceridemia y resistencia a la insulina, las cuales se acentúan durante el embarazo y la lactancia. Sin embargo, dichas alteraciones metabólicas en las hembras F0, ocurren desde etapas pre gestacionales en la que se lleva a cabo la producción de gametos que darán origen a los descendientes F1.

La obesidad materna en la fase pre-gestacional puede ser considerada como un factor programador muy importante (Durmus et al., 2013), debido que la obesidad y diversas alteraciones metabólicas asociadas a ella, tienen un efecto adverso en la función reproductiva especialmente en la hembra. Dentro del contexto del concepto DOHaD, el aspecto más importante de la función reproductiva de la generación F0, para la fisiología de los descendientes F1 es la calidad de los gametos. En el caso de la obesidad materna, se sabe que el estado metabólico de las hembras F0 impacta negativamente en el proceso de maduración de los ovocitos (Galarza, Rhon Calderon, Cortez, & Faletti, 2017; Snider & Wood, 2019), cuya maduración se lleva a cabo en el organismo de la hembra F0 desde antes del nacimiento. Por lo tanto, se considera que la obesidad materna pre gestacional tiene un efecto que impacta directamente sobre la generación F1.

Es importante reconocer los efectos fisiológicos ocasionados por la dieta alta en grasa durante la pubertad de la hembra, ya que es una de las ventanas críticas más importantes para la programación de la función reproductiva, debido a los cambios fisiológicos y morfológicos que ocurren en esta etapa del desarrollo del aparato reproductor de la generación F0 y consecuentemente en la fisiología de la producción de gametos competentes que darán origen a la generación F1.a.

De acuerdo a la curva de crecimiento materno obtenida (Fig. 8), no se observaron cambios en peso corporal entre los grupos C y MO antes de los 77 días de edad. Es decir no es posible detectar cambios en el peso corporal durante la pubertad y

adolescencia de las ratas, que ocurre específicamente entre los 36 y 60 días de edad en las hembras (Leibowitz, Akabayashi, Alexander, Karatayev, & Chang, 2009; Sengupta, 2013). Sin embargo, no se puede descartar la ocurrencia de efectos fisiológicos adversos en la pubertad, asociados tanto a la dieta alta en grasa, que hayan impactado en el desarrollo de la función reproductiva materna y por lo tanto en la calidad de la producción de gametos.

Existen diversos efectos adversos ocasionados por la dieta alta en grasa. El más relevante es la acumulación excesiva de tejido adiposo y consecuentemente la alteración de sus funciones metabólicas y endocrinas. Específicamente, una de las alteraciones en la función endocrina del tejido adiposo que tiene más impacto sobre la función reproductiva es la producción anormal de adipocinas, la cual puede ser considerada como uno de los factores que ejercen un efecto negativo en la producción de gametos competentes y de buena calidad.

De acuerdo a los resultados experimentales, las hembras F0 del grupo OM mostraron un aumento de peso corporal a los 84 días de edad, correspondiendo a la edad de adulto joven, de acuerdo al desarrollo de la función reproductiva de la rata hembra (Sengupta, 2013).

Debido a que en estudios previos se han reportado parámetros fisiológicos y hormonales asociados a la función reproductiva, los alcances del presente estudio, no incluyeron determinaciones de la duración de las fases ciclo estral y hormonas sexuales durante la pubertad. Pero en experimentos usando el modelo de obesidad materna realizado previamente por nuestro grupo de trabajo (Vega et al., 2013), se ha observado que a los 120 días de edad las hembras del grupo OM, un incremento de más del doble en la concentración de leptina y una disminución en la concentración de estradiol (Vega et al., 2013).

Por lo tanto, se puede decir que los efectos de la dieta alta en grasa en la hembra F0 en edad adulta a diferencia de los efectos observados durante la pubertad, pueden alterar la regulación de la función reproductiva a nivel central, afectando la fisiología del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, lo que posiblemente explique la baja

fertilidad reportada en las hembras OM en dicho estudio que fue del 23 % (Vega et al., 2013). Dicho hallazgo complementa a las evidencias clínicas y experimentales que postulan que la obesidad materna afecta la función reproductiva impactando negativamente en la fertilidad de mujeres con obesidad cuyos mecanismos implicados son desconocidos en gran medida (Jungheim, Travieso, Carson, & Moley, 2012).

Aunque el presente estudio se enfoca principalmente en los efectos de la obesidad materna previa y durante la gestación y lactancia sobre el tejido adiposo de los descendientes, es importante señalar que los efectos fisiológicos programados pueden originarse desde antes de la fecundación. A este respecto se ha propuesto que para prevenir de manera efectiva la mejor intervención para prevenir los efectos intergeneracionales de la obesidad materna, indudablemente será aquella que inicie antes de la edad reproductiva (Nivoit et al., 2009).

En el presente trabajo, se observó que las hembras OM, a los 120 días de edad fueron 23% más pesadas que el grupo C. Este resultado fue acorde a uno de los primeros estudios con el modelo de obesidad materna realizados por nuestro grupo de trabajo, en donde las hembras OM tuvieron un incremento de 22% en el peso corporal respecto al grupo control. (Zambrano et al., 2010). La interpretación del significado del estado nutricional materno en términos de las medidas morfo-métricas asociadas a la composición corporal debe de hacerse con sumo cuidado. Sin embargo, se puede notar que no es necesario que se alcancen valores extremos en la ganancia de peso corporal en las madres, para alterar el fenotipo de los descendientes, al menos si esta ganancia de peso ha resultado de una trayectoria nutricional adversa desde etapas tempranas en la vida posnatal. Es sabido que el metabolismo materno presenta alteraciones de carácter fisiológico, cuya función es mantener un desarrollo fetal adecuado para las necesidades de cada momento durante esta etapa (E. Zambrano, Ibáñez, et al., 2016). Por lo tanto, es posible que las alteraciones tanto en el peso corporal materno, como en los parámetros bioquímicos y hormonales asociados a éstas durante la etapa pre gestacional podría

tener un impacto directo en las adaptaciones metabólicas maternas durante la gestación.

Tanto en modelos con roedores (Lopez-Luna, Maier, & Herrera, 1991; Lopez-Luna, Munoz, & Herrera, 1986) como en estudios en humanos (Villar et al., 1992), se ha observado que durante los primeros dos tercios de la gestación, la secreción de insulina permite la acumulación de grasa corporal. Por lo tanto, se considera que el carácter metabólico de esta etapa gestacional es predominantemente anabólico en la madre (Herrera, 2000, 2002; King, 2006). En el presente estudio, si bien se observó que el peso corporal materno al inicio de la gestación fue mayor en las hembras F0 del grupo OM (Fig. 4), la ganancia relativa de peso corporal dentro de cada grupo en los primeros 14 días de la gestación, fue la misma en los grupos C y OM. En estudios experimentales con roedores (Herrera, 2000, 2002) y epidemiológicos en humanos (Villar et al., 1992) se ha observado que el último tercio de la gestación, se caracteriza por el estado de resistencia a la insulina de la madre. Este estado de resistencia a la insulina, es de carácter fisiológico y su función es redirigir los nutrientes energéticos ingeridos por la madre hacia el feto y por lo tanto se considera que el carácter metabólico en la gestación tardía es predominante catabólico para la madre (Herrera, 2000, 2002; King, 2006).

La lactancia materna es muy importante para el desarrollo del recién nacido, ya que es fundamental para la protección contra algunas enfermedades, especialmente las que están relacionadas a alteraciones metabólicas y endócrinas (Francisco et al., 2018). Se considera también que la lactancia materna tiene un gran potencial para la transmisión intergeneracional de enfermedades, por lo tanto, la lactancia es un periodo de gran relevancia en el campo de estudio del contexto DOHaD, incluso existen numerosas evidencias que corroboran el carácter de la lactancia como el de una ventana crítica de programación metabólica muy importante (Francisco et al., 2018; Grundleger, Thenen, Pasquine, & Godbole, 1981; Guarda et al., 2014).

Desde el punto de vista del concepto DOHaD, la leche materna constituye un medio por el cual el recién nacido recibe gran parte de los estímulos ambientales del medio

en que se desarrolla. Debido a que los estímulos de la leche materna se reciben durante una etapa temprana del desarrollo, se puede considerar que tiene un potencial programador muy importante. Uno de los principales moduladores de los estímulos ambientales que recibe el recién nacido alimentado con leche materna, es el estado fisiológico de la propia madre. En este contexto, el papel modulador de la leche materna posiblemente, sea conferido tanto por su contenido de nutrimentos como por su contenido de moléculas bio-activas, las cuales pueden ser hormonas esteroideas, adipocinas, factores de protección inmunológica, entre otros con capacidad de alterar la maduración de órganos y sistemas del neonato.

La función más importante de lactancia materna es la transferencia de nutrientes de la hembra F0 a sus descendientes F1, en consecuencia debe de haber adaptaciones metabólicas maternas con carácter fisiológico que faciliten este proceso, de manera similar a las adaptaciones maternas durante la gestación tardía. Se ha demostrado, mediante la determinación de perfiles lipídicos de ratas experimentales amamantando en condiciones fisiológicas, así como en estudios con humanos, un incremento en las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) circulantes, el cual comienza en la gestación y permanece en los primeros días post-parto (Knopp et al., 1985). Estos hallazgos sugieren que en la madre sigue una fase catabólica activa, de manera similar a la que es observada del último tercio de la gestación.

En el caso de la obesidad materna durante la lactancia, es posible que este estado catabólico se exacerbe afectando la cantidad y calidad, tanto de nutrientes como de componentes bio-activos transferidos a la cría a través de la leche materna. En el presente estudio se observó una reducción gradual del peso corporal materno F0 del grupo OM, que fue evidente en los primeros 8 días de lactancia, la cual estuvo acompañada al final de la lactancia, al día 21, con signos de resistencia a la insulina (Fig. 5), y aumento en la concentración de triglicéridos, confirmando un estado catabólico materno exacerbado por la alimentación alta en grasa previa y durante la gestación y lactancia.

De acuerdo a los resultados de la madres F0 del grupo OM durante la lactancia, se observó pérdida de masa corporal e hipertrigliceridemia, lo que indica que una cantidad importante de grasa corporal es movilizada a lo largo de todo el periodo de lactancia. De tal forma que, estos hallazgos sugieren que los lípidos movilizados en la madre finalmente sean transferidos a la cría a través de la leche.

En un estudio previo utilizando el modelo de obesidad materna, realizados dentro de nuestro grupo de trabajo (Bautista et al., 2016) se confirmó que la dieta alta en grasa, como la que se empleó en el desarrollo del presente trabajo, ocasiona que la leche producida en el grupo OM, al día 20 de lactancia, tenga un alto contenido de grasa total, baja la cantidad de agua y también se confirmó que, en términos de la cantidad de proteína, los grupos C y OM fueron similares. No obstante, se observó que en la leche materna del grupo OM, en comparación con el C, se detectó mayor cantidad de ácido araquidónico (AA) y; menor cantidad de los ácidos eicosapentanoíco (EPA) y docosahexanoíco (DHA). Lo que sugiere que la dieta materna, alta en grasa, además de incrementar la cantidad de grasa total transferida a la cría, también disminuye la calidad de la grasa ingerida por la cría (Bautista et al., 2016).

Cada vez hay mayor evidencia en humanos, que durante el último tercio de la gestación y los primeros 6 meses de lactancia, se requiere un gran aporte de AA y DHA debido a que la velocidad de transformación de sus precursores en el hígado fetal y neonatal no es suficiente para cubrir los requerimientos nutricionales de esta etapa del desarrollo (Valenzuela B. & Nieto K., 2003). Por lo tanto es la madre quien los tiene que aportar a través del transporte placentario durante la gestación y a través de la leche durante la lactancia.

De acuerdo estudios previos (Bautista et al., 2016), la leche materna del grupo OM tendría una deficiencia de EPA y DHA y quizás un aporte excesivo de AA, lo que representa un posible factor de programación, en especial para el desarrollo del sistema nervioso y para la función visual. Sin embargo, todavía no está del todo claro cómo es que un desbalance en la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados

(PUFAs por sus siglas en inglés) podría ejercer un efecto programador en la regulación metabólica, siendo una interrogante de importancia clínica y fisiológica. Se sabe por estudios asociados a modelos experimentales, de diferentes procesos del desarrollo en la edad adulta, que en particular los PUFAs ω -3 (como el EPA y DHA) suprimen mientras que los PUFAs (como el AA) 6 promueven la diferenciación celular (Mansara, Deshpande, Vaidya, & Kaul-Ghanekar, 2015), un hecho que podría ser crucial en diferentes órganos y sistemas que respondan a estos estímulos durante la gestación y lactancia.

DESCENDIENTES F1 DE MADRES OBESAS

Una de las primeras observaciones que contribuyeron para el desarrollo del concepto DOHaD, fue la asociación del peso corporal al nacimiento, de datos obtenidos en el sureste de Inglaterra en los primeros años del siglo XX con diversos parámetros fisiológicos en la edad adulta a mediados del mismo siglo (D. J. Barker, 1995; D. J. Barker & Osmond, 1986; D. J. P. Barker, 1998). De esta forma se destaca la importancia predictiva que tiene el peso corporal sobre la trayectoria de desarrollo en la vida posnatal. Los resultados obtenidos en el presente estudio, respecto al peso corporal al nacimiento de las crías F1 fue menor únicamente en los machos OM, hecho que no se contrapone a lo reportado en este modelo por nuestro equipo de trabajo anteriormente (Ibáñez Chávez & Zambrano González, 2014; E. Zambrano, et al., 2010); incluso otros grupos de investigación han observado que la obesidad materna puede reducir el tamaño fetal (Jungheim et al., 2010). Sin embargo, es necesario aclarar que en comparación con los humanos los roedores nacen menos desarrollados (Luzzo et al., 2012), por otra parte en mujeres con obesidad severa y obesidad mórbida se ha reportado una proporción significativa de nacimiento de infantes cuyo peso al nacer es menor al percentil 10 correspondiente a su edad gestacional, considerados pequeños para su edad gestacional (SGA por sus siglas en inglés) (Desai & Ross, 2011), de hecho un estudio europeo ha reportado incidencia del 18% individuos SGA descendientes de

mujeres obesas en comparación con el 10 % de SGA de la población en general (Rajasingam, Seed, Briley, Shennan, & Poston, 2009)

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 (OMS, 2000). No obstante, los individuos con obesidad no sólo difieren en la cantidad de grasa corporal que acumulan, sino también en su distribución corporal, debido a distribución regional de la grasa que induce la ganancia de peso corporal influye sobre la intensidad y tipo de riesgo a la salud. En estudios previos utilizando un modelo experimental como el que se empleó en el presente trabajo, se observó que las hembras F0 alimentadas con dieta alta en grasa desde el destete, el justo antes del apareamiento, a los 120 días de edad muestran mayor cantidad de grasa retroperitoneal (Santos et al., 2015; Vega et al., 2013).

En este trabajo, no se observaron diferencias en el peso corporal ni en la ingesta de alimento en las crías de los grupos C y OM a la edad de adulto joven. Sin embargo se observó mayor acumulación de tejido adiposo visceral en los machos y hembras OM respecto al C. Si bien el análisis de la composición corporal realizado por RMN en los machos no mostró diferencias en la cantidad de masa grasa entre los grupos C y MO, el análisis por DEXA indica que en los descendientes OM, un mayor porcentaje de su peso corporal corresponde a masa grasa, así mismo, el índice de adiposidad indica que existe un mayor contenido de tejido adiposo visceral en los descendientes OM. El contraste observado entre los resultados observados, respecto a la composición corporal de los machos, puede deberse al principio de determinación de cada método, en el caso de la MRI, el cual es considerado como el estándar de oro para la determinación de la composición corporal, se basa en el análisis de los espectros de absorción/emisión de ondas de radio, conocido como el desplazamiento químico, asociado la alineación/relajación de los espines mediante la magnetización de los núcleos de los átomos de hidrogeno de las moléculas de grasa. Dicha técnica tienen una alta especificidad y sensibilidad, capaz de registrar el contenido total de la grasa presente en un organismo de

manera independiente de su localización anatómica, por lo que la cantidad de grasa detectada corresponderá a la grasa presente en todos los componentes grasos del cuerpo, en donde además de la grasa visceral, es capaz de detectar la grasa subcutánea, la grasa contenida en otros tejidos como las neuronas, hígado, la embebida entre los tejidos como el musculo y la que está contenida en el interior de la célula formando parte de las membranas de los organelos. En contraste con la técnica del DXA, el principio de determinación se basa en la absorción de rayos X de alta y baja energía, lo que permite detectar con gran especificidad la cantidad de tejido óseo, el cual se caracteriza por tener una composición química con elementos electrodensos así como la cantidad de tejido blando, con una composición química con elementos menos electrodensos que el tejido óseo. El análisis de una imagen obtenida por DXA permite establecer con precisión la densidad de absorción de rayos X de cada región analizada, por lo que es posible determinar con precisión en cada región la cantidad de tejido adiposo que en general tiene una baja absorción de rayos X. A diferencia de la RMN la técnica de DXA para determinar la composición corporal tiene un carácter más anatómico. En este sentido se puede resaltar la utilidad del IA para la determinación del estado metabólico de un organismo, debido a que esta determinación se basa únicamente en la cantidad de tejido adiposo visceral, el cual tiene una gran asociación con la resistencia a la insulina, dislipidemia y riesgo cardio-vascular.

Los resultados reportados en este trabajo sugieren que la obesidad materna programa mayor en la acumulación de grasa visceral en los descendientes. De hecho, el exceso de grasa abdominal es un factor de riesgo tan importante para el desarrollo de enfermedades metabólicas como el exceso de grasa corporal *per se* (Hwang et al., 2015). En general, se acepta que la grasa que se almacena en el segmento central del cuerpo está asociado a efectos adversos en el metabolismo energético y se considera como un predictor de diabetes, enfermedad cardiovascular e hipertensión entre otros (Bergman et al., 2006). De igual forma se acepta que la resistencia a la insulina es un factor esencial en la asociación entre la

acumulación excesiva de grasa visceral y el riesgo de enfermedad metabólica (Imbeault et al., 1999).

En el análisis histológico del tejido adiposo se observó que si bien el tamaño del adipocito en los descendientes F1 del grupo OM es mayor respecto al C en términos de la mediana, la comparación de las distribuciones acumuladas de ambos grupos demuestra que existen diferencias aún más marcadas en los extremos de la distribución (tanto en la región de los adipocitos pequeños como de los grandes). Sin embargo, las pruebas de normalidad realizadas en el presente estudio demuestran que el tamaño del adipocito no puede ser modelado por la distribución Gaussiana, por lo que el análisis de la distribución se realizó utilizando la distribución Gamma, la cual en realidad consiste en una familia de distribuciones que pueden tomar una gran variedad de formas incluyendo distribuciones asimétricas y sesgadas a la izquierda o bien pueden ser simétricas pero con una amplia dispersión. De hecho, se observó que en los machos y hembras del grupo C, la distribución de tamaño del adipocito es asimétrica y sesgada a la izquierda, es decir, que los datos se concentran en la región de los adipocitos pequeños, aunque es posible observar una cola pesada que representa una proporción baja de adipocitos de grandes pero que se encuentran distribuidos en un amplio rango de tamaños. Así mismo se observó que en machos y hembras los descendientes F1 del grupo OM los adipocitos son de mayor tamaño con una distribución más simétrica y con mayor dispersión. En donde es posible observar un desplazamiento de la distribución hacia los tamaños más grandes, de esta forma, el modelo matemático empleado fue útil para ambos grupos experimentales, lo que denota que

Es evidente que las características del tamaño del adipocito observadas en este estudio, tienen varias implicaciones metodológicas en el análisis histológico, quizá una de las más importantes sea el hecho de que las medidas de tendencia central como la media aritmética, la cual es usada con frecuencia, no sean la más representativa. Sin embargo, de acuerdo al análisis de la distribución del tamaño del adipocito utilizando la distribución gamma, la obesidad materna programa la

forma y amplitud de la distribución, lo que en consecuencia origina diferencias en las proporciones de adipocitos pequeños y grandes.

En el caso de las crías F1 de madres obesas, tanto machos como en hembras se observó que la proporción de adipocitos pequeños fue menor respecto al grupo C y la proporción de adipocitos grandes fue mayor en los OM. Sin embargo, podemos afirmar que los efectos de la obesidad materna sobre la forma de distribución de tamaño del adipocito en F1, fueron diferentes en hembras y machos. Debido a que las variaciones en las proporciones de adipocitos grandes y pequeños observada en el grupo OM respecto al control fueron más acentuadas en los machos que en las hembras.

Respecto a la proporción de adipocitos pequeños, en los machos OM, se observó que ésta se redujo 100 veces respecto al C, mientras que en las hembras OM se redujo 25 veces respecto al C. Dado que la cantidad de adipocitos pequeños se asocia directamente a la sensibilidad a la insulina, (Meyer, Ciaraldi, Henry, Wittgrove, & Phillips, 2013; Tandon et al., 2018) este hallazgo puede explicar en gran medida por que se observó en los machos descendientes F1 del grupo C que tuvieron un IRI = 3.6, el cual se incrementó en el grupo OM con IRI=6.1 , mientras que en las hembras F1 del grupo C se observó un IRI= 3.5 , el cual se incrementó en el grupo OM con IRI = 5.6 .

En el caso de la proporciones de adipocitos grandes, se puede decir que los efectos observados fueron mucho más marcados en los machos que en las hembras y de acuerdo a las comparaciones de las curvas de frecuencia acumulada se puede decir la tanto la forma como la amplitud de la distribución de tamaño se programó de manera diferente en machos y hembras F1 en respuesta a la obesidad materna, lo cual puede ser un indicativo de las diferencias programadas en su mecanismo de expansión. Una consecuencia importante de la programación de la distribución del tamaño del adipocito específica para cada sexo, consiste en la alteración de las proporciones de adipocitos pequeños y grandes, lo que puede asociarse a alteraciones el estado metabólico que dependen en gran medida del tejido adiposo.

Respecto a la cantidad de adipocitos grandes se observó que en los machos OM, dicha proporción aumento 6.9 veces respecto al C y en las hembras OM aumentó 3.9 veces respecto al C. Dado que la hipertrofia del tejido adiposo, está directamente ligada a la hipetrigliceridemia, el aumento en la proporción de adipocitos grandes se puede asociar al incremento en la concentración de triglicéridos tanto en los machos, como en las hembras del grupo OM respecto al C; Por otra parte, el aumento de la proporción de adipocitos grandes puede estar asociado a la hiperleptinemia en los machos OM, pero no en las hembras OM, las cuales presentaron concentraciones de leptina similares a las del grupo C. Aunque estos resultados confirman los hallazgos reportados en la literatura a partir de los que se propone una relación directa entre el tamaño del adipocito y los niveles de leptina (Zhang, Guo, Diaz, Heo, & Leibel, 2002), de acuerdo a los resultados de este trabajo, se puede sugerir que la concentración de leptina se podría asociar de manera más específica a la amplitud y desplazamiento de la distribución y que se refleja en el tamaño máximo del adipocito, ya que en los C se observó un tamaño máximo de $6\ 500\ \mu\text{m}^2$ OM en donde se observaron adipocitos con un tamaño máximo de $12000\ \mu\text{m}^2$ respecto a las hembras C $5\ 750\text{OM}$ con adipocitos de un tamaño máximo de $8750\ \mu\text{m}^2$. La amplia dispersión y desplazamiento de la distribución del tamaño de los adipocitos de los machos OM, es una consecuencia de la disminución de adipocitos pequeños y a un aumento de tamaño pero del número de los adipocitos grandes, ya que en el extremo derecho de la distribución se observa un aumento el tamaño del adipocito sin aumento de su frecuencia originado una cola derecha pesada muy pesada, haciendo que la distribución carezca de la asimetría observada en el grupo C.

La cantidad de adipocitos pequeños suele asociarse a un tejido que se encuentra en expansión hiperplásica y un aumento en su frecuencia de estos en los extremos cercanos al cero dentro de la distribución del tamaño de un depósito de grasa en particular, sugiere que el proceso adipogénico correspondiente a la diferenciación de los precursores se encuentra activo. En el caso se de los machos F1 del grupo MO se observa que prácticamente esta población es inexistente ($<0.1\%$ del total de

los adipocitos), dicha observación, podría estar asociada a alteraciones en la diferenciación temprana de los adipocitos. De acuerdo a la expresión de los genes maestros de la adipogénesis en la FEV, si bien el incremento en la expresión del PPAR- γ en los machos F1 sugiere un incremento en el compromiso de los precursores para diferenciarse a adipocitos, no obstante la expresión disminuida de CEBP- α demuestra alteraciones en el proceso. Existen evidencias experimentales de que la expresión del PPAR- γ es obligada y puede ser suficiente para mantener la adipogénesis (Farmer, 2006; Rosen & MacDougald, 2006; Siersbæk, Nielsen, & Mandrup, 2012) y de que el CEBP- α , es necesario para mantener el estado diferenciado del adipocito en el tejido adiposo blanco (Linhart et al., 2001; N.-d. Wang et al., 1995). Incluso, se ha observado que tanto en animales knock out CEBPa-/- (Linhart et al., 2001) así como en animales con ablación posnatal del gen CEBPa (Yang et al., 2005) demuestran que los adipocitos que alcanzan a diferenciarse muestran rasgos de resistencia a la insulina, por lo que estos animales muestran alteraciones compatibles con el síndrome metabólico. Por otra parte se ha establecido que el potencial adipogénico es reducido en fibroblastos con expresión deficiente de CEBP- α , al parecer este comportamiento se explica por la dificultad de los preadipocitos para comenzar a formar vacuolas de grasa (Wu et al., 1999).

En el caso de las hembras F1 del grupo OM, podemos observar que en la FEV la expresión de los genes maestros reguladores de la adipogénesis PPAR- γ y CEBP- α se encuentra regulada a la alta, lo que sugiere que el potencial adipogénico de los precursores de los adipocitos está incrementado. Por lo que, si bien existe una disminución en la proporción de adipocitos pequeños, esta no es tan marcada como en los machos.

El arreglo utilizado para el análisis de la expresión génica en el tejido adiposo maduro resultó de gran utilidad para evaluar el mecanismo de expansión en machos y hembras descendientes de madres obesas ya que si bien el arreglo está diseñado para evaluar el proceso adipogénico, éste incluye genes cuya expresión debe de ser mantenida desde las fases iniciales de la adipogénesis como la etapa de

compromiso de los pre adipocitos y que en etapas tardías juegan un papel importante en la regulación del metabolismo. Así mismo, dicho arreglo contiene genes que son característicos de la diferenciación terminal y muchos de ellos además de funcionar como marcadores de maduración tienen un papel importante en la regulación metabólica. Por otra parte, el arreglo empleado por la cantidad de genes que contiene, ofrece la posibilidad de llevar a cabo la asociación funcional de los genes diferencialmente expresados, mediante algoritmos de búsqueda en bases de datos mediante herramientas bioinformáticas.

Uno de los hallazgos más importantes del presente estudio, fue que la expresión génica asociada a la expansión del tejido adiposo programada por la obesidad materna es diferente en hembras y machos. Además de que la cantidad de genes diferencialmente expresados en los descendientes de madres obesas fue mayor en los machos (63%) que en las hembras (18%), se observó que fue en direcciones opuestas, es decir mientras que los genes diferencialmente expresados mostraron estar regulados a la baja en los machos, en las hembras se observó que fueron regulados a la alta. Así mismo el análisis de la asociación funcional de estos genes demostró que los procesos celulares afectados fueron diferentes en machos y hembras de los descendientes de madres obesas. Estos hallazgos, junto con los análisis del tamaño del adipocito sugieren que las diferencias en la distribución están directamente asociadas con la expresión del tejido adiposo, en especial de los genes relacionados a la diferenciación terminal.

En cuanto a la expresión de las proteínas asociadas a la regulación del ciclo celular, se ha descrito que deficiencias en la regulación de este proceso están asociadas con la hipertrofia del tejido adiposo (Palsgaard et al., 2012). De acuerdo a la asociación funcional de los genes diferencialmente expresados en los machos F1 descendientes de madres obesas, se observó que diversos genes que regulan la progresión del ciclo celular en el adipocito se encuentran expresados a la baja. La importancia de la expresión génica de proteínas que permitan la progresión del ciclo celular en el adipocito, radica en que la expresión de muchos genes que codifican la expresión de proteínas que regulan la lipólisis y lipogénesis depende del ciclo

celular. Se observaron efectos importantes en genes clave para mantener el estado diferenciado del adipocito, por ejemplo el CEBP- α mostró menor, el cual es uno de los genes maestros de la adipogénesis. Como se mencionó anteriormente, es un gen importante en la etapa de compromiso del adiposo, pero su papel en la diferenciación terminal está asociado con la sensibilidad a la insulina. Así mismo, se observó en los machos F1 del grupo OM menor expresión de las proteínas Cdk4, Rb1 junto con el factor de transcripción E2f1, que en conjunto son fundamentales para mantener la sensibilidad a la insulina en el adipocito diferenciado (Denechaud, Fajas, & Giralt, 2017). Es posible que las deficiencias en la expresión de proteínas que regulan el ciclo celular tenga como consecuencia la inhibición de la expresión de diversos receptores nucleares, dichos genes son fundamentales para la función del adipocito, ya que muchos de ellos como, el receptor de oxisteroles LXR α , RX α , PPAR- α y Lpl funcionan como una especie de sensores nutricionales a nivel celular y es a través de ellos que la célula puede activar la lipólisis al censar abundancia de lípidos (Jacobi, Stanya, & Lee, 2012). Por lo que es posible que la falta de expresión de estas proteínas esté implicada en aumento de tamaño de los adipocitos diferenciados, quizás de una manera descontrolada ya que en la distribución de tamaños se observa una gran dispersión en los machos F1 del grupo MO.

Hasta este punto se puede asociar el fenotipo observado en la distribución del tamaño del adipocito en los machos MO F1 con la resistencia a la insulina. La cual podemos decir que está programada en los machos descendientes de madres obesas y probablemente sea originada por las alteraciones en la regulación del ciclo celular. Es posible que dichas alteraciones ocurran desde la fase del compromiso de los preadipocitos, ya que como observamos en el caso de la expresión del CEBP- α , se encuentra regulada a la baja tanto las células de la FEV que contienen a los preadipocitos como en el tejido adiposo de los machos.

Todos estos hallazgos explican la resistencia a la insulina en los machos, de hecho se observa disminución en la ya que la expresión del gen que codifica para el GLUT4 (Slc2a4) y diversas proteínas necesarias para la señalización de la insulina. Sin embargo en el caso de las hembras en las que también se observa resistencia a la

insulina se observan otras alteraciones en la expresión génica del tejido adiposo, principalmente un incremento en la vía de señalización de las MAPK, lo que podría estar asociado a la acumulación excesiva de lípidos en el adipocito. Por otra parte se ha descrito que la activación de esta vía explica el origen de la resistencia a la insulina, la cual aunque no es tan marcada como en los machos es evidente en las hembras F1 del grupo OM.

Debido a que la vía de señalización WNT se ha asociado a la inhibición de la proliferación de los precursores de los adipocitos (E. Zambrano & Nathanielsz, 2013), la baja cantidad observada de adipocitos pequeños podría explicarse por este hecho. Es sabido que la disminución de la expresión de proteínas de la vía WNT podría favorecer la diferenciación de los pre adipocitos a adipocitos maduros, lo que resultaría en un incremento en la producción de los adipocitos recién diferenciados. Sin embargo es posible que la disminución de las proteínas Wnt6, Wnt10a, y Wnt10b que en principio favorece la adipogénesis (Prestwich & Macdougald, 2007) sea consecuencia de una respuesta compensatoria ante la resistencia a la insulina. Incluso, se ha asociado el desarrollo de la resistencia a la insulina con deficiencias en la señalización de la WNT (Cawthorn et al., 2012)... Cabe señalar que la mayor parte de los genes asociados a la vía de Wnt corresponden a proteínas secretadas y que ejercen efectos parácrinos, los cuales conforman los ciclos de retroalimentación que en el tejido adiposo originan la producción de nuevos adipocitos a partir de sus precursores. Especialmente la presencia de proteínas Wnt, se ha descrito como un freno molecular para la producción de adipocitos a partir de sus precursores, lo que explique al menos en parte el incremento en la expresión del PPAR- γ de la FEV de los machos F1 del grupo OM.

De acuerdo a los resultados obtenidos al analizar el perfil de expresión adipogénico de las crías de madres obesas, es posible que las alteraciones en los genes que regulan la progresión del ciclo celular en el tejido adiposo de los machos sea incapaz de expresar la maquinaria molecular suficiente para ejercer su papel en la regulación del metabolismo así como para promover el reclutamiento de nuevos

adipocitos. En el caso de las hembras, parece que la alteración existe en fases tardías del proceso de diferenciación, en la cual el almacenamiento de grasa podría estar incrementado debido al incremento de la expresión de las proteínas asociadas a MAPK (Inoue et al., 2008).

En estudios similares con roedores alimentados con dietas obesogénicas (tipo cafetería y altas en grasa) durante 4 meses, se ha reportado que en el tejido adiposo retroperitoneal se incrementa la expresión de genes adipogénicos asociados al incremento de la actividad termogénica y a la proliferación de los precursores del adipocito, lo que sugiere que la dieta obesogénica origina una respuesta adaptativa al incremento de la ingesta energética. Debido a que se expresan proteínas encargadas de la disipación de energía como la UCP1. Los resultados obtenidos en el presente estudio en contraste, sugieren la inhibición de la proliferación de precursores del adipocito, en donde el proceso de diferenciación se favorece pero con la expresión deficiente de proteínas funcionales, en particular, las participantes en la señalización a la insulina, lo que podría explicar en gran medida los valores de HOMA incrementados.

Los lípidos, además de funcionar como una reserva energética y componente estructural de la célula, actúan tanto como activadores de la transcripción y moléculas de señalización. Un exceso de lípidos en el ambiente fetal puede regular a la expresión génica asociada a los censo de lípidos y metabolismo mediante mecanismos epigenéticos (Heerwagen et al., 2010).

CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo, en términos metabólicos, de acumulación de grasa corporal, distribución del tamaño del adipocito y expresión génica, indican que el mecanismo de expansión del tejido adiposo en respuesta a la obesidad materna se programa de manera diferente en machos y hembras.

En el caso de los machos, en el tejido adiposo, se observó, un aumento exacerbado en la proporción de adipocitos grandes junto con la disminución de la proporción de adipocitos pequeños a lo largo de una distribución de tamaños muy amplia, así como una disminución significativa de la expresión genes propios de la diferenciación terminal; en la FEV se observó una alteración en el patrón de expresión de los genes maestros de la adipogénesis. Estos resultados sugieren que la programación del mecanismo de expansión del tejido adiposo en los machos, se da principalmente por hipertrofia debido, por una parte, a deficiencias en la diferenciación de los adipocitos a partir de sus precursores y por otra parte desarrollo de adipocitos disfuncionales que no expresan la maquinaria molecular suficiente para ejercer de manera óptima su papel regulador en el metabolismo de lípidos y carbohidratos.

En el caso de las hembras, si bien, en el tejido adiposo se observó mayor proporción de adipocitos grandes y menor proporción de adipocitos pequeños, los efectos de la obesidad materna en la distribución de tamaño del adipocito fueron diferentes, ya que la dispersión de los tamaños que fue menor que en el caso de los machos; así mismo, se observó un incremento la expresión de genes asociados a las vías de señalización que favorecen la acumulación excesiva de lípidos y la progresión de la resistencia a la insulina. En la FEV, los análisis moleculares demostraron mayor expresión de los genes maestros de la adipogénesis. Dichos resultados sugieren que la programación del mecanismo de expansión del tejido adiposo en las hembras, se debe por una parte al incremento en la diferenciación de adipocitos a partir de sus precursores (favoreciendo el carácter hiperplásico en comparación con

los machos) y al aumento en la expresión de genes que favorecen la acumulación y producción excesiva de lípidos en los adipocitos diferenciados.

PERSPECTIVAS

Es posible que la expresión de diversos genes adipogénicos esté relacionada directamente con el tamaño del adipocito, por lo que será necesario analizar la expresión de genes involucrados en la regulación de la adipogénesis en adipocitos separados de acuerdo a su tamaño. También se puede sugerir que la obesidad materna en los machos programa la disminución en la expresión de genes adipogénicos característicos de la diferenciación temprana y reguladores del ciclo celular en el adipocito; mientras que en las hembras la obesidad materna programa mayor expresión de génica asociada en fases tardías de la maduración del adipocito, por lo que sería necesario hacer ensayos funcionales en precursores del adipocito aislados en descendientes de madres obesas. Debido a que es probable que estas modificaciones en la regulación de la adipogénesis, se hayan programado como una respuesta de los precursores del adipocito ante al ambiente materno durante la gestación y lactancia, caracterizado por la abundancia de lípidos y carbohidratos. Así mismo se sugiere que el origen de la hipertrofia del tejido adiposo programada por la obesidad materna, está asociada a la disminución de la capacidad proliferativa, a diferencia de la obesidad alimentaria que en sus fases iniciales promueve mayor proliferación, lo que origina las alteraciones metabólicas observadas.

REFERENCIAS

- Ambeskovic, M., Roseboom, T. J., & Metz, G. A. S. (2017). Transgenerational effects of early environmental insults on aging and disease incidence. *Neurosci Biobehav Rev*. doi:10.1016/j.neubiorev.2017.08.002
- Anway, M. D., Cupp, A. S., Uzumcu, M., & Skinner, M. K. (2005). Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science*, 308(5727), 1466-1469. doi:10.1126/science.1108190
- Arner, E., Westermark, P. O., Spalding, K. L., Britton, T., Ryden, M., Frisen, J., . . . Arner, P. (2010). Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology. *Diabetes*, 59(1), 105-109. doi:10.2337/db09-0942
- Arner, E., Westermark, P. O., Spalding, K. L., Britton, T., Rydén, M., Frisén, J., . . . Arner, P. (2010). Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology. *Diabetes*, 59(1), 105-109.
- Baker, J. L., Olsen, L. W., & Sorensen, T. I. (2007). Childhood body-mass index and the risk of coronary heart disease in adulthood. *N Engl J Med*, 357(23), 2329-2337. doi:10.1056/NEJMoa072515
- Barker, D. J. (1995). Fetal origins of coronary heart disease. *Bmj*, 311(6998), 171-174.
- Barker, D. J. (2007). The origins of the developmental origins theory. *Journal of internal medicine*, 261(5), 412-417.
- Barker, D. J., & Osmond, C. (1986). Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *The Lancet*, 327(8489), 1077-1081.
- Barker, D. J. P. (1998). *Mothers, babies, and health in later life*: Elsevier Health Sciences.
- Bateson, P., Barker, D., Clutton-Brock, T., Deb, D., D'Udine, B., Foley, R. A., . . . Sultan, S. E. (2004). Developmental plasticity and human health. *Nature*, 430(6998), 419-421. doi:10.1038/nature02725
- Bautista, C. J., Montano, S., Ramirez, V., Morales, A., Nathanielsz, P. W., Bobadilla, N. A., & Zambrano, E. (2016). Changes in milk composition in obese rats consuming a high-fat diet. *Br J Nutr*, 115(3), 538-546. doi:10.1017/s0007114515004547
- Bautista, C. J., Rodriguez-Gonzalez, G. L., Morales, A., Lomas-Soria, C., Cruz-Perez, F., Reyes-Castro, L. A., & Zambrano, E. (2017). Maternal obesity in the rat impairs male offspring aging of the testicular antioxidant defence system. *Reprod Fertil Dev*, 29(10), 1950-1957. doi:10.1071/rd16277
- Bergman, R. N., Kim, S. P., Catalano, K. J., Hsu, I. R., Chiu, J. D., Kabir, M., . . . Ader, M. (2006). Why visceral fat is bad: mechanisms of the metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)*, 14 Suppl 1, 16S-19S. doi:10.1038/oby.2006.277
- Bhargava, S. K., Sachdev, H. S., Fall, C. H., Osmond, C., Lakshmy, R., Barker, D. J., . . . Reddy, K. S. (2004). Relation of serial changes in childhood body-mass index to impaired glucose tolerance in young adulthood. *N Engl J Med*, 350(9), 865-875. doi:10.1056/NEJMoa035698
- Bieswal, F., Ahn, M.-T., Reusens, B., Holvoet, P., Raes, M., Rees, W. D., & Remacle, C. (2006). The Importance of Catch-up Growth after Early Malnutrition for the Programming of Obesity in Male Rat. *Obesity*, 14(8), 1330-1343. doi:10.1038/oby.2006.151
- Boklage, C. E. (2012). Human Embryogenesis *Embryogenesis*.
- Borengasser, S. J., Zhong, Y., Kang, P., Lindsey, F., Ronis, M. J. J., Badger, T. M., . . . Shankar, K. (2013). Maternal Obesity Enhances White Adipose Tissue Differentiation and Alters Genome-Scale DNA Methylation in Male Rat Offspring. *Endocrinology*, 154(11), 4113-4125. doi:10.1210/en.2012-2255
- Burggren, W. W., & Mueller, C. A. (2015). Developmental Critical Windows and Sensitive Periods as Three-Dimensional Constructs in Time and Space. *Physiological and Biochemical Zoology*, 88(2), 91-102. doi:10.1086/679906
- Butte, N. F. (2000). Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(5), 1256S-1261S. doi:10.1093/ajcn/71.5.1256s
- Cawthorn, W. P., Bree, A. J., Yao, Y., Du, B., Hemati, N., Martinez-Santibanez, G., & MacDougald, O. A. (2012). Wnt6, Wnt10a and Wnt10b inhibit adipogenesis and stimulate

- osteoblastogenesis through a beta-catenin-dependent mechanism. *Bone*, 50(2), 477-489. doi:10.1016/j.bone.2011.08.010
- Chen, D., Zhao, M., & Mundy, G. R. (2004). Bone Morphogenetic Proteins. *Growth Factors*, 22(4), 233-241. doi:10.1080/08977190412331279890
- Cinti, S. (2005). The adipose organ. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 73(1), 9-15. doi:10.1016/j.plefa.2005.04.010
- Corvino, S. B., Volpato, G. T., Macedo, N. C. D., Sinzato, Y. K., Rudge, M. V. C., & Damasceno, D. C. (2015). Physiological and biochemical measurements before, during and after pregnancy of healthy rats. *Acta Cirurgica Brasileira*, 30, 668-674.
- Denechaud, P.-D., Fajas, L., & Giralt, A. (2017). E2F1, a Novel Regulator of Metabolism. *Frontiers in endocrinology*, 8, 311-311. doi:10.3389/fendo.2017.00311
- Desai, M., & Ross, M. G. (2011). Fetal programming of adipose tissue: effects of intrauterine growth restriction and maternal obesity/high-fat diet. *Seminars in reproductive medicine*, 29(3), 237-245. doi:10.1055/s-0031-1275517
- Durmus, B., Arends, L. R., Ay, L., Hokken-Koelega, A. C., Raat, H., Hofman, A., . . . Jaddoe, V. W. (2013). Parental anthropometrics, early growth and the risk of overweight in pre-school children: the Generation R Study. *Pediatr Obes*, 8(5), 339-350. doi:10.1111/j.2047-6310.2012.00114.x
- Engelbregt, M. J. T., van Weissenbruch, M. M., Popp-Snijders, C., Lips, P., & Delemarre-van de Waal, H. A. (2001). Body Mass Index, Body Composition, and Leptin at Onset of Puberty in Male and Female Rats after Intrauterine Growth Retardation and after Early Postnatal Food Restriction. *Pediatric Research*, 50, 474. doi:10.1203/00006450-200110000-00009
- Escobar-Gómez, F., Jódar, E., & Hawkins, F. (2009). Receptor Wnt: fisiología, fisiopatología y potenciales nuevas dianas terapéuticas. *Revista Española de Enfermedades Metabólicas Óseas*, 18(2), 39-44. doi:[https://doi.org/10.1016/S1132-8460\(09\)72053-7](https://doi.org/10.1016/S1132-8460(09)72053-7)
- Farmer, S. R. (2006). Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell metabolism*, 4(4), 263-273.
- Ferenc, J.-S., & Néda, Z. (2007). On the size distribution of Poisson Voronoi cells. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 385(2), 518-526. doi:<https://doi.org/10.1016/j.physa.2007.07.063>
- Francisco, F. A., Barella, L. F., Silveira, S. d. S., Saavedra, L. P. J., Prates, K. V., Alves, V. S., . . . Gomes, R. M. (2018). Methylglyoxal treatment in lactating mothers leads to type 2 diabetes phenotype in male rat offspring at adulthood. *European Journal of Nutrition*, 57(2), 477-486. doi:10.1007/s00394-016-1330-x
- Franck, N., Stenkula, K. G., Öst, A., Lindström, T., Strålfors, P., & Nystrom, F. H. (2007). Insulin-induced GLUT4 translocation to the plasma membrane is blunted in large compared with small primary fat cells isolated from the same individual. *Diabetologia*, 50(8), 1716-1722. doi:10.1007/s00125-007-0713-1
- Gaillard, R., Steegers, E. A., Duijts, L., Felix, J. F., Hofman, A., Franco, O. H., & Jaddoe, V. W. (2014). Childhood cardiometabolic outcomes of maternal obesity during pregnancy: the Generation R Study. *Hypertension*, 63(4), 683-691. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02671
- Galarza, R. A., Rhon Calderon, E. A., Cortez, A. E., & Faletti, A. G. (2017). Maternal Overweight Disrupts the Sexual Maturation of the Offspring. *Reprod Sci*, 24(9), 1284-1292. doi:10.1177/1933719116683809
- Gluckman, P. D., Buklijas, T., & Hanson, M. A. (2016). Chapter 1 - The Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) Concept: Past, Present, and Future. In C. S. Rosenfeld (Ed.), *The Epigenome and Developmental Origins of Health and Disease* (pp. 1-15). Boston: Academic Press.
- Godfrey, K. M., Reynolds, R. M., Prescott, S. L., Nyirenda, M., Jaddoe, V. W., Eriksson, J. G., & Broekman, B. F. (2017). Influence of maternal obesity on the long-term health of offspring. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 5(1), 53-64. doi:10.1016/S2213-8587(16)30107-3
- Gore, A. C. (2015). Prenatal Programming and Endocrinology. *Endocrinology*, 156(10), 3403-3404. doi:10.1210/en.2015-1671
- Grundleger, M. L., Thenen, S. W., Pasquine, T. A., & Godbole, V. Y. (1981). Composition of Rat Milk from Day 5 to 20 of Lactation and Milk Intake of Lean and Preobese Zucker Pups. *The Journal of Nutrition*, 111(3), 480-487. doi:10.1093/jn/111.3.480

- Guarda, D. S., Lisboa, P. C., de Oliveira, E., Nogueira-Neto, J. F., de Moura, E. G., & Figueiredo, M. S. (2014). Flaxseed oil during lactation changes milk and body composition in male and female suckling pups rats. *Food and Chemical Toxicology*, 69, 69-75. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.04.003>
- Heerwagen, M. J., Miller, M. R., Barbour, L. A., & Friedman, J. E. (2010). Maternal obesity and fetal metabolic programming: a fertile epigenetic soil. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 299(3), R711-722. doi:10.1152/ajpregu.00310.2010
- Heindel, J. J., & Vandenberg, L. N. (2015). Developmental origins of health and disease: a paradigm for understanding disease cause and prevention. *Curr Opin Pediatr*, 27(2), 248-253. doi:10.1097/MOP.0000000000000191
- Herrera, E. (2000). Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. *Eur J Clin Nutr*, 54 Suppl 1, S47-51.
- Herrera, E. (2002). Implications of dietary fatty acids during pregnancy on placental, fetal and postnatal development--a review. *Placenta*, 23 Suppl A, S9-19. doi:10.1053/plac.2002.0771
- Hirchi, J. (1970). *Cellularity of obese and nonobese human adipose tissue*. Paper presented at the Fed Proc.
- Ho, S.-M., Cheong, A., Adgent, M. A., Veevers, J., Suen, A. A., Tam, N. N. C., . . . Williams, C. J. (2017). Environmental factors, epigenetics, and developmental origin of reproductive disorders. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 68, 85-104. doi:10.1016/j.reprotox.2016.07.011
- Hwang, Y. C., Hayashi, T., Fujimoto, W. Y., Kahn, S. E., Leonetti, D. L., McNeely, M. J., & Boyko, E. J. (2015). Visceral abdominal fat accumulation predicts the conversion of metabolically healthy obese subjects to an unhealthy phenotype. *International Journal Of Obesity*, 39, 1365. doi:10.1038/ijo.2015.75
- Ibáñez Chávez, C. A., & Zambrano González, E. (2014). *Beneficio del ejercicio en las crías descendientes de ratas con obesidad experimental*.
- Imbeault, P., Lemieux, S., Prud'homme, D., Tremblay, A., Nadeau, A., Despres, J. P., & Mauriege, P. (1999). Relationship of visceral adipose tissue to metabolic risk factors for coronary heart disease: is there a contribution of subcutaneous fat cell hypertrophy? *Metabolism*, 48(3), 355-362.
- Inoue, N., Yahagi, N., Yamamoto, T., Ishikawa, M., Watanabe, K., Matsuzaka, T., . . . Shimano, H. (2008). Cyclin-dependent kinase inhibitor, p21WAF1/CIP1, is involved in adipocyte differentiation and hypertrophy, linking to obesity, and insulin resistance. *J Biol Chem*, 283(30), 21220-21229. doi:10.1074/jbc.M801824200
- Jacobi, D., Stanya, K. J., & Lee, C.-H. (2012). Adipose tissue signaling by nuclear receptors in metabolic complications of obesity. *Adipocyte*, 1(1), 4-12. doi:10.4161/adip.19036
- Jensen, L. J., Kuhn, M., Stark, M., Chaffron, S., Creevey, C., Muller, J., . . . von Mering, C. (2009). STRING 8--a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res*, 37(Database issue), D412-416. doi:10.1093/nar/gkn760
- Jo, J., Shreif, Z., & Periwal, V. (2012). Quantitative dynamics of adipose cells. *Adipocyte*, 1(2), 80-88. doi:10.4161/adip.19705
- Joe, A. W., Yi, L., Even, Y., Vogl, A. W., & Rossi, F. M. (2009). Depot-specific differences in adipogenic progenitor abundance and proliferative response to high-fat diet. *Stem Cells*, 27(10), 2563-2570. doi:10.1002/stem.190
- Joulia-Ekaza, D., & Cabello, G. (2006). Myostatin regulation of muscle development: molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects. *Exp Cell Res*, 312(13), 2401-2414. doi:10.1016/j.yexcr.2006.04.012
- Jungheim, E. S., Schoeller, E. L., Marquard, K. L., Loudon, E. D., Schaffer, J. E., & Moley, K. H. (2010). Diet-induced obesity model: abnormal oocytes and persistent growth abnormalities in the offspring. *Endocrinology*, 151(8), 4039-4046. doi:en.2010-0098 [pii]
- 10.1210/en.2010-0098
- Junien, C., Fneich, S., Panchenko, P., Voisin, S., & Gabory, A. (2015). Sexual Dimorphism and DOHaD through the Lens of Epigenetics: Genetic, Ancestral, Developmental, and Environmental Origins from Previous to the Next Generation(s) (pp. 389–424).

- King, J. C. (2006). Maternal obesity, metabolism, and pregnancy outcomes. *Annu Rev Nutr*, 26, 271-291. doi:10.1146/annurev.nutr.24.012003.132249
- Knittle, J. L., Timmers, K., Ginsberg-Fellner, F., Brown, R. E., & Katz, D. P. (1979). The growth of adipose tissue in children and adolescents. Cross-sectional and longitudinal studies of adipose cell number and size. *J Clin Invest*, 63(2), 239-246. doi:10.1172/jci109295
- Knopp, R. H., Walden, C. E., Wahl, P. W., Bergelin, R., Chapman, M., Irvine, S., & Albers, J. J. (1985). Effect of postpartum lactation on lipoprotein lipids and apoproteins. *J Clin Endocrinol Metab*, 60(3), 542-547. doi:10.1210/jcem-60-3-542
- Kumar, M. V., Sunvold, G. D., & Scarpace, P. J. (1999). Dietary vitamin A supplementation in rats: suppression of leptin and induction of UCP1 mRNA. *Journal of lipid research*, 40(5), 824-829.
- Lazar, E. A., Mason, J. K., MacPherson, R. D., & Srolovitz, D. J. (2013). Statistical topology of three-dimensional Poisson-Voronoi cells and cell boundary networks. *Physical Review E*, 88(6), 063309.
- Lecoutre, S., & Breton, C. (2014). The cellularity of offspring's adipose tissue is programmed by maternal nutritional manipulations. *Adipocyte*, 3(4), 256-262. doi:10.4161/adip.29806
- Lecoutre, S., & Breton, C. (2015). Maternal nutritional manipulations program adipose tissue dysfunction in offspring. *Frontiers in Physiology*, 6(158). doi:10.3389/fphys.2015.00158
- Lecoutre, S., Deracinois, B., Laborie, C., Eberlé, D., Guinez, C., Panchenko, P. E., . . . Breton, C. (2016). Depot- and sex-specific effects of maternal obesity in offspring's adipose tissue. *230(1)*, 39. doi:10.1530/joe-16-0037
- Leibowitz, S. F., Akabayashi, A., Alexander, J., Karatayev, O., & Chang, G. Q. (2009). Puberty onset in female rats: relationship with fat intake, ovarian steroids and the peptides, galanin and enkephalin, in the paraventricular and medial preoptic nuclei. *Journal of neuroendocrinology*, 21(6), 538-549. doi:10.1111/j.1365-2826.2009.01870.x
- Linhart, H. G., Ishimura-Oka, K., DeMayo, F., Kibe, T., Repka, D., Poindexter, B., . . . Darlington, G. J. (2001). C/EBP α is required for differentiation of white, but not brown, adipose tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(22), 12532-12537.
- Lomas-Soria, C., Reyes-Castro, L. A., Rodriguez-Gonzalez, G. L., Ibanez, C. A., Bautista, C. J., Cox, L. A., . . . Zambrano, E. (2018). Maternal obesity has sex-dependent effects on insulin, glucose and lipid metabolism and the liver transcriptome in young adult rat offspring. *J Physiol*, 596(19), 4611-4628. doi:10.1111/jp276372
- Lopez-Luna, P., Maier, I., & Herrera, E. (1991). Carcass and tissue fat content in the pregnant rat. *Biol Neonate*, 60(1), 29-38. doi:10.1159/000243385
- Lopez-Luna, P., Munoz, T., & Herrera, E. (1986). Body fat in pregnant rats at mid- and late-gestation. *Life Sci*, 39(15), 1389-1393.
- Lukaszewski, M.-A., Eberlé, D., Vieau, D., & Breton, C. (2013). Nutritional manipulations in the perinatal period program adipose tissue in offspring. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 305(10), E1195-E1207. doi:10.1152/ajpendo.00231.2013
- Luzzo, K. M., Wang, Q., Purcell, S. H., Chi, M., Jimenez, P. T., Grindler, N., . . . Moley, K. H. (2012). High fat diet induced developmental defects in the mouse: oocyte meiotic aneuploidy and fetal growth retardation/brain defects. *PloS one*, 7(11), e49217. doi:10.1371/journal.pone.0049217
- Majka, S. M., Barak, Y., & Klemm, D. J. (2011). Concise review: adipocyte origins: weighing the possibilities. *Stem Cells*, 29(7), 1034-1040. doi:10.1002/stem.653
- Mansara, P. P., Deshpande, R. A., Vaidya, M. M., & Kaul-Ghanekar, R. (2015). Differential Ratios of Omega Fatty Acids (AA/EPA+DHA) Modulate Growth, Lipid Peroxidation and Expression of Tumor Regulatory MARBPs in Breast Cancer Cell Lines MCF7 and MDA-MB-231. *PloS one*, 10(9), e0136542-e0136542. doi:10.1371/journal.pone.0136542
- Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. F., & Turner, R. C. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 28(7), 412-419.
- Meyer, L. K., Ciaraldi, T. P., Henry, R. R., Wittgrove, A. C., & Phillips, S. A. (2013). Adipose tissue depot and cell size dependency of adiponectin synthesis and secretion in human obesity. *Adipocyte*, 2(4), 217-226. doi:10.4161/adip.24953

- Montenegro, Y. H. A., Nascimento, D. Q., Assis, T. O., & Santos-Lopes, S. S. D. (2019). The epigenetics of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in fetal development. *Ann Hum Genet*. doi:10.1111/ahg.12306
- Muhlhausler, B., & Smith, S. R. (2009). Early-life origins of metabolic dysfunction: role of the adipocyte. *Trends Endocrinol Metab*, 20(2), 51-57. doi:10.1016/j.tem.2008.10.006
- Nicholson, T. B., Veland, N., & Chen, T. (2015). Chapter 3 - Writers, Readers, and Erasers of Epigenetic Marks. In S. G. Gray (Ed.), *Epigenetic Cancer Therapy* (pp. 31-66). Boston: Academic Press.
- Nivoit, P., Morens, C., Van Assche, F. A., Jansen, E., Poston, L., Remacle, C., & Reusens, B. (2009). Established diet-induced obesity in female rats leads to offspring hyperphagia, adiposity and insulin resistance. *Diabetologia*, 52(6), 1133-1142. doi:10.1007/s00125-009-1316-9
- OMS. (2000). *Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation* (0512-3054 (Print)
- 0512-3054 (Linking)). Retrieved from
- Palsgaard, J., Emanuelli, B., Winnay, J. N., Sumara, G., Karsenty, G., & Kahn, C. R. (2012). Cross-talk between insulin and Wnt signaling in preadipocytes: role of Wnt co-receptor low density lipoprotein receptor-related protein-5 (LRP5). *J Biol Chem*, 287(15), 12016-12026. doi:10.1074/jbc.M111.337048
- Panik, M. J. (2005). *Advanced statistics from an elementary point of view*. Boston: Elsevier/Academic Press.
- Pellegrinelli, V., Carobbio, S., & Vidal-Puig, A. (2016). Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues. *Diabetologia*, 59(6), 1075-1088. doi:10.1007/s00125-016-3933-4
- Perng, W., Gillman, M. W., Mantzoros, C. S., & Oken, E. (2014). A prospective study of maternal prenatal weight and offspring cardiometabolic health in midchildhood. *Ann Epidemiol*, 24(11), 793-800 e791. doi:10.1016/j.annepidem.2014.08.002
- Prestwich, T. C., & Macdougald, O. A. (2007). Wnt/beta-catenin signaling in adipogenesis and metabolism. *Curr Opin Cell Biol*, 19(6), 612-617. doi:10.1016/j.ceb.2007.09.014
- Rajasingam, D., Seed, P. T., Briley, A. L., Shennan, A. H., & Poston, L. (2009). A prospective study of pregnancy outcome and biomarkers of oxidative stress in nulliparous obese women. *Am J Obstet Gynecol*, 200(4), 395 e391-399. doi:10.1016/j.ajog.2008.10.047
- Rodriguez-Gonzalez, G. L., Vega, C. C., Boeck, L., Vazquez, M., Bautista, C. J., Reyes-Castro, L. A., . . . Zambrano, E. (2015). Maternal obesity and overnutrition increase oxidative stress in male rat offspring reproductive system and decrease fertility. *Int J Obes (Lond)*, 39(4), 549-556. doi:10.1038/ijo.2014.209
- Rodriguez, J. S., Rodriguez-Gonzalez, G. L., Reyes-Castro, L. A., Ibanez, C., Ramirez, A., Chavira, R., . . . Zambrano, E. (2012). Maternal obesity in the rat programs male offspring exploratory, learning and motivation behavior: prevention by dietary intervention pre-gestation or in gestation. *Int J Dev Neurosci*, 30(2), 75-81. doi:10.1016/j.ijdevneu.2011.12.012
- Rosen, E. D., & MacDougald, O. A. (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. *Nature reviews Molecular cell biology*, 7(12), 885.
- Rosenfeld, C. S. (2016). *The epigenome and developmental origins of health and disease*. London, UK: Academic Press, an imprint of Elsevier.
- Sachdev, H. P., Osmond, C., Fall, C. H., Lakshmy, R., Ramji, S., Dey Biswas, S. K., . . . Bhargava, S. K. (2009). Predicting adult metabolic syndrome from childhood body mass index: follow-up of the New Delhi birth cohort. *Arch Dis Child*, 94(10), 768-774. doi:10.1136/adc.2008.140905
- Santos, M., Rodriguez-Gonzalez, G. L., Ibanez, C., Vega, C. C., Nathanielsz, P. W., & Zambrano, E. (2015). Adult exercise effects on oxidative stress and reproductive programming in male offspring of obese rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 308(3), R219-225. doi:10.1152/ajpregu.00398.2014
- Sengupta, P. (2013). The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *International journal of preventive medicine*, 4(6), 624-630.

- Siersbæk, R., Nielsen, R., & Mandrup, S. (2012). Transcriptional networks and chromatin remodeling controlling adipogenesis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 23(2), 56-64.
- 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(3), 1023-1033. doi:10.1210/jc.2006-1055
- Snider, A. P., & Wood, J. R. (2019). Obesity Induces Ovarian Inflammation and Reduces Oocyte Quality. *Reproduction*. doi:10.1530/rep-18-0583
- Spalding, K. L., Arner, E., Westermark, P. O., Bernard, S., Buchholz, B. A., Bergmann, O., . . . Arner, P. (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*, 453, 783. doi:10.1038/nature06902

<https://www.nature.com/articles/nature06902#supplementary-information>

- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., . . . Mering, C. V. (2019). STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res*, 47(D1), D607-d613. doi:10.1093/nar/gky1131
- Tandon, P., Wafer, R., & Minchin, J. E. (2018). Adipose morphology and metabolic disease. *Journal of Experimental Biology*, 221(Suppl 1), jeb164970.
- Tanemura, M. (2003). *Statistical distributions of Poisson Voronoi cells in two and three dimensions* (Vol. 18).
- Tang, Q. Q., & Lane, M. D. (2012). Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem*, 81, 715-736. doi:10.1146/annurev-biochem-052110-115718
- Taylor, B. A., & Phillips, S. J. (1996). Detection of obesity QTLs on mouse chromosomes 1 and 7 by selective DNA pooling. *Genomics*, 34(3), 389-398. doi:S0888-7543(96)90302-X [pii]

10.1006/geno.1996.0302

- Taylor, P. D., Matthews, P. A., Khan, I. Y., Rees, D., Itani, N., & Poston, L. (2018). Generation of Maternal Obesity Models in Studies of Developmental Programming in Rodents. In P. C. Guest (Ed.), *Investigations of Early Nutrition Effects on Long-Term Health: Methods and Applications* (pp. 167-199). New York, NY: Springer New York.
- Taylor, P. D., & Poston, L. (2007). Developmental programming of obesity in mammals. *Exp Physiol*, 92(2), 287-298. doi:10.1113/expphysiol.2005.032854
- Valenzuela B., A., & Nieto K., S. (2003). Ácidos grasos omega-6 y omega-3 en la nutrición perinatal: su importancia en el desarrollo del sistema nervioso y visual. *Revista chilena de pediatría*, 74, 149-157.
- Van Den Bergh, B. R. H. (2011). Developmental programming of early brain and behaviour development and mental health: a conceptual framework. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 53(s4), 19-23. doi:10.1111/j.1469-8749.2011.04057.x
- Vega, C. C., Reyes-Castro, L. A., Bautista, C. J., Larrea, F., Nathanielsz, P. W., & Zambrano, E. (2013). Exercise in obese female rats has beneficial effects on maternal and male and female offspring metabolism. *International Journal Of Obesity*, 39, 712. doi:10.1038/ijo.2013.150

<https://www.nature.com/articles/ijo2013150#supplementary-information>

- Villar, J., Cogswell, M., Kestler, E., Castillo, P., Menendez, R., & Repke, J. T. (1992). Effect of fat and fat-free mass deposition during pregnancy on birth weight. *Am J Obstet Gynecol*, 167(5), 1344-1352.
- Wadhwa, P. D., Buss, C., Entringer, S., & Swanson, J. M. (2009). Developmental origins of health and disease: brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms. *Seminars in reproductive medicine*, 27(5), 358-368. doi:10.1055/s-0029-1237424
- Wang, M.-Y., Grayburn, P., Chen, S., Ravazzola, M., Orci, L., & Unger, R. H. (2008). Adipogenic capacity and the susceptibility to type 2 diabetes and metabolic syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(16), 6139-6144. doi:10.1073/pnas.0801981105
- Wang, N.-d., Finegold, M. J., Bradley, A., Ou, C. N., Abdelsayed, S. V., Wilde, M. D., . . . Darlington, G. J. (1995). Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science*, 269(5227), 1108-1112.

- Willert, K., & Nusse, R. (2012). Wnt proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(9), a007864. doi:10.1101/cshperspect.a007864
- Wu, Z., Rosen, E. D., Brun, R., Hauser, S., Adelmant, G., Troy, A. E., . . . Spiegelman, B. M. (1999). Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell*, 3(2), 151-158.
- Yang, J., Croniger, C. M., Lekstrom-Himes, J., Zhang, P., Fenyus, M., Tenen, D. G., . . . Hanson, R. W. (2005). Metabolic response of mice to a postnatal ablation of CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *Journal of Biological Chemistry*, 280(46), 38689-38699.
- Zambrano, E., et al. (2010). Dietary intervention prior to pregnancy reverses metabolic programming in male offspring of obese rats. *J Physiol*, 588(Pt 10), 1791-1799.
- Zambrano, E., Ibáñez, C., Martínez-Samayoa, P. M., Lomas-Soria, C., Durand-Carbajal, M., & Rodríguez-Gonzalez, G. L. (2016). Maternal Obesity: Lifelong Metabolic Outcomes for Offspring from Poor Developmental Trajectories During the Perinatal Period. *Arch Med Res*, 47(1), 1-12. doi:10.1016/j.arcmed.2016.01.004
- Zambrano, E., Martínez-Samayoa, P. M., Rodríguez-Gonzalez, G. L., & Nathanielsz, P. W. (2010). Dietary intervention prior to pregnancy reverses metabolic programming in male offspring of obese rats. *J Physiol*, 588(Pt 10), 1791-1799. doi:10.1113/jphysiol.2010.190033
- Zambrano, E., & Nathanielsz, P. W. (2013). Mechanisms by which maternal obesity programs offspring for obesity: evidence from animal studies. *Nutr Rev*, 71 Suppl 1, S42-54. doi:10.1111/nure.12068
- Zambrano, E., Sosa-Larios, T., Calzada, L., Ibáñez, C. A., Mendoza-Rodríguez, C. A., Morales, A., & Morimoto, S. (2016). Decreased basal insulin secretion from pancreatic islets of pups in a rat model of maternal obesity. *J Endocrinol*, 231(1), 49-57. doi:10.1530/joe-16-0321
- Zhang, Y., Guo, K.-Y., Diaz, P. A., Heo, M., & Leibel, R. L. (2002). Determinants of leptin gene expression in fat depots of lean mice. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 282(1), R226-R234. doi:10.1152/ajpregu.00392.2001

ANEXOS

1. PUBLICACIONES DERIVADAS DEL PROYECTO DE TESIS

Different statistical approaches to characterization of adipocyte size in offspring of obese rats: effects of maternal or offspring exercise intervention..... 92

A high fat diet during adolescence in male rats negatively programs reproductive and metabolic function which is partially ameliorated by exercise 105

Different statistical approaches to characterization of adipocyte size in offspring of obese rats: effects of maternal or offspring exercise intervention.



Different Statistical Approaches to Characterization of Adipocyte Size in Offspring of Obese Rats: Effects of Maternal or Offspring Exercise Intervention

Carlos A. Ibáñez¹, Magaly Vázquez-Martínez¹, J. Carlos León-Contreras², Luis A. Reyes-Castro¹, Guadalupe L. Rodríguez-González¹, Claudia J. Bautista¹, Peter W. Nathanielsz³ and Elena Zambrano^{1*}

¹ Reproductive Biology Department, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico, ² Experimental Pathology Section, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico, ³ Department of Animal Science, University of Wyoming, Laramie, WY, United States

OPEN ACCESS

Edited by:
Janna L. Morrison,
University of South Australia, Australia

Reviewed by:
Júlio Cezar De Oliveira,
Federal University of Mato Grosso,
Brazil
Luciana Venturini Rossoni,
Universidade de São Paulo, Brazil

***Correspondence:**
Elena Zambrano
zamgon@unam.mx

Specialty section:
This article was submitted to
Integrative Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 16 July 2018

Accepted: 19 October 2018

Published: 15 November 2018

Citation:
Ibáñez CA, Vázquez-Martínez M,
León-Contreras JC, Reyes-Castro LA,
Rodríguez-González GL, Bautista CJ,
Nathanielsz PW and Zambrano E
(2018) Different Statistical
Approaches to Characterization
of Adipocyte Size in Offspring
of Obese Rats: Effects of Maternal or
Offspring Exercise Intervention.
Front. Physiol. 9:1571.
doi: 10.3389/fphys.2018.01571

Adipocyte size (AS) shows asymmetric distribution related to current metabolic state, e.g., adipogenesis or lipolysis. We profiled AS distribution using different statistical approaches in offspring (F1) of control (C) and obese (MO) mothers (FO) with and without F0 or F1 exercise. Offspring from F0 exercise were designated CF0ex and MOF0ex. Exercised F1 of sedentary mothers were designated CF1ex and MOF1ex. F1 retroperitoneal fat cross-sectional AS was measured by median, cumulative distributions, data dispersion and extreme values based on gamma distribution modeling. F1 metabolic parameters: body weight, retroperitoneal fat, adiposity index (AI), serum leptin, triglycerides (TG) and insulin resistance index (IRI) were measured. Male and female F1 AS showed different cumulative distribution between C and MO ($p < 0.0001$) therefore comparisons were performed among C, CF0ex and CF1ex groups and MO, MOF0ex and MOF1ex groups. MO AI was higher than C ($p < 0.05$) and male MOF1ex AI lower than MO ($p < 0.05$). Median AS was higher in male and female MO vs. C ($p < 0.05$). Male and female MOF0ex and MOF1ex reduced median AS ($p < 0.05$). Lower AS dispersion was observed in male CF1ex and MOF1ex vs. CF0ex and MOF0ex, respectively. MO reduced small and increased large adipocyte proportions vs. C ($p < 0.05$); MOF0ex increased small and MOF1ex the proportion of large adipocytes vs. MO ($p < 0.05$). MOF0ex reduced male IRI and female TG vs. MO ($p < 0.05$). MOF1ex reduced male and female leptin ($p < 0.05$); CF1ex reduced male leptin ($p < 0.05$). Conclusions: several factors, diet, physical activity and gender modify AS distribution. Conventional AS distribution methods normally do not include analyzes of extreme, large and small adipocytes, which characterize different phenotypes. Maternal high fat diet affects F1 AS distribution, which was programmed during development. F0ex and F1ex have gender specific F1 beneficial effects. AS distribution characterization helps explain adipose tissue metabolic changes

in different physiological conditions and will aid design of efficacious interventions to prevent and/or recuperate adverse developmental programming outcomes. Finally, precise identification of effects of specific interventions as exercise of F0 and/or F1 are needed to improve outcomes in obese women and their obesity prone offspring.

Keywords: adipocyte, adipocyte size distribution, adipose tissue, maternal obesity, exercise intervention

INTRODUCTION

We (Zambrano et al., 2010, 2016; Rodriguez et al., 2012; Santos et al., 2015; Vega et al., 2015; Bautista et al., 2017) and others (Sen and Simmons, 2010; Elshenawy and Simmons, 2016; Lecoutre et al., 2016; Wankhade et al., 2016) have studied the rat as an experimental animal model of the metabolic consequences of maternal (F0) obesity (MO) in offspring (F1). In addition, several studies have shown differential responses in male and female F1 from obese mothers (Vega et al., 2015; Almeida et al., 2017; Carrillo et al., 2017). Variable physiological conditions can profoundly either reduce or increase adipose tissue lipid storage capacity by up to 15-fold (Berry et al., 2013). Adipose tissue volume expansion depends on two mechanisms: hypertrophy [increased adipocyte size (AS)] and/or hyperplasia (increased adipocyte number) (Ali et al., 2013; Cohen and Spiegelman, 2016). Increased AS has been related to pathogenesis of insulin resistance, dyslipidemia and impaired adipokine secretion (Murphy et al., 2017) and represents an easily quantifiable marker of adipose tissue dysfunction that can be compared across pathologies (Jung and Choi, 2014).

Adipocytes isolated by collagenase digestion can be accurately analyzed by Coulter counting or flow cytometry (Hirsch and Gallian, 1968; McLaughlin et al., 2014; Fang et al., 2015). However, this approach has many disadvantages due to the potential cell damage by protease activity, incomplete cell separation and lack of specificity of automatic particle detection. In addition, AS obtained from isolated adipocytes is often reported as multimodal histograms (Bradshaw et al., 2003), whose statistical distribution is frequently empirically modeled by sophisticated differential equations (Jo et al., 2009, 2010, 2013), which potentially discourage their generalized use.

Histological determination of AS has many advantages over isolated cell methods in terms of specificity of adipocyte detection, since cell morphology and structure are better conserved by paraformaldehyde fixation and paraffin embedding (Parlee et al., 2014). Moreover, adipocyte boundaries, can be easily delimited in a digitalized microscope field and the area enclosed by each individual cell can be accurately quantified with common image analysis software (Berry et al., 2014).

Due to high AS heterogeneity, there is currently no single generally accepted method for size comparison and analysis. For example, we (Zambrano et al., 2010), and others (Chen and Farese, 2002; Bringhentì et al., 2011) have generally compared mean AS by the commonest parametric methods. Nevertheless, AS in several conditions cannot be analyzed under the assumption of a normal distribution. Consequently, AS median size is usually compared by non-parametric statistics test (Berends et al., 2013), and descriptive statistics are employed to

show AS differences at extreme values. Many published papers only address changes in larger cells (Laye et al., 2009; Jo et al., 2010; Baik et al., 2014; Fukuda-Tsuru et al., 2014).

Since an increased proportion of large adipocytes is associated with increased differentiation rates (Camp et al., 2002; McLaughlin et al., 2007; Skurk et al., 2007); and increased proportion of small adipocytes is associated with augmented proliferative rate (Kajita et al., 2012), it has become of interest to determine AS distribution between large and small sized adipocytes under several physiologic conditions to elucidate the cellular mechanisms involved in expansion of specific fat depots. Thus, it is likely that different proportions of small, medium and large adipocytes will provide insight into different cellular mechanisms of adipose tissue expansion. It has been proposed that “cross-sectional static cell-size distributions for a range of snapshots of animal development can be used to deduce the dynamics of adipose tissue growth, if we can appropriately analyze the snapshots with the help of mathematical modeling” (Jo et al., 2009).

In this report, several approaches are proposed to characterize the AS distribution in terms of AS central tendency (represented either as mean or median), measures of data dispersion and extreme values of AS. Measures regarding data spread and data distribution shape were estimated under gamma distribution assumption. Adipocyte boundaries in a histological slide resemble a tiling composed of polygons with all the vertices pointing outward similar to a Poisson-Voronoi diagram, thereby allowing the use of gamma distribution as a statistical model (Tanemura, 2003).

We studied our well-established rat model of increased F1 adiposity programmed by F0 obesity to characterize the AS distribution by different analytical approaches. Since F0 (Vega et al., 2015) and F1 (Santos et al., 2015) exercise interventions (F0ex and F1ex) lead to different F1 metabolic benefits, we hypothesize that different AS distribution will be observed depending on the nature of the exercise intervention.

MATERIALS AND METHODS

Ethical Approval

This study was carried out in accordance with the recommendations of Mexican law on animal protection (NOM-062-ZOO-1999). The protocol (BRE-112/CINVA 271) was approved by Animal Experimentation Ethics Committee of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). Female albino Wistar rats were born and maintained in the animal facility of the INCMNSZ, accredited by

the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International (AAALAC).

Experimental Design

Rats were maintained under controlled lighting (lights on from 07:00 to 19:00 h at 22–23°C) and fed normal laboratory chow (Zeigler Rodent RQ22-5, United States) containing 22.0% protein, 5.0% fat, 31.0% polysaccharide, 31.0% simple sugars, 4.0% fiber, 6.0% minerals and 1.0% vitamins (w/w), energy 4.0 kcal g⁻¹. Between 16 and 17 weeks of age, when they weighed 200–240 g, females were bred to randomly assigned, non-litter mate, proven male breeders. At delivery, on day 0, litters that provided Founder Generation (F0) mothers were culled to 10 pups, each containing at least four females. At weaning (day 21) one female F0 pup from each litter was randomly assigned to either a control (C; *n* = 16) group fed laboratory chow or to a maternal obesity group (MO; *n* = 16) fed a high energy, obesogenic diet containing 23.5% protein, 20.0% animal lard, 5.0% fat, 20.2% polysaccharide, 20.2% simple sugars, 5.0% fiber, 5.0% mineral mix, 1.0% vitamin mix (w/w), energy 4.9 kcal g⁻¹; diet contents, including vitamin and mineral mix were according to the recommendation for rodents of the American Institute of Nutrition/AIN-93G (Reeves et al., 1993). Thus, each F0 group contained only one female from any litter and F0 females in different groups, but not within groups, were sisters, providing homogeneity in F0 mothers' own developmental programming and genetics.

At day 90, 1 month before breeding, one half of C and MO F0 were randomly selected to continue their diet and begin voluntary wheel-running exercise at (C exercised—CF0ex; MO exercised—MOF0ex). The opportunity to wheel run was available through pregnancy. Remaining females continued with their respective diets during pregnancy and lactation (Figure 1).

F0 female rats were placed with proven male breeders on day 120 and conceived during the next cycle. The day in which spermatozoa were detected in a vaginal smear was designed as day of conception—day 0. To minimize consumption of the high energy-obesogenic diet by the males during the mating period, males were placed with females at night and removed each morning. Male breeders did not perform any exercise. Lactating mothers were maintained on their pregnancy diet. Litter size and pup weight were recorded at birth. F1 anogenital distance was measured to identify males and females (Zambrano et al., 2006). To ensure F1 homogeneity, on postnatal day (PND) 2, all litters studied were adjusted to 10 pups with equal numbers of males and females as closely as possible. F1 were weaned at PND 21, housed five per cage and fed Chow diet throughout the study. At PND 50 eight males and eight females from C and MO sedentary mothers from different litters were randomly selected to begin voluntary wheel-running exercise (C exercised—CF1ex; MO exercised—MOF1ex). F1 from maternal exercise intervention were called CF0ex and MOF0ex, whilst F1 from offspring exercise intervention were denoted as CF1ex and MOF1ex (Figure 1).

F0 Voluntary Exercise

CF0ex and MOF0ex rats were adapted to wheel run on 2 days on the week before day 90 allowing the rats to be in contact with the

rodent wheel in 15-min sessions. From day 90 to breeding at 120 were trained five times a week following a schedule established in a previous study and consisted of a 15-min run followed by a 15-min rest and a second 15-min run between 9:00 and 12:00 h (Vega et al., 2016). F0 rats during pregnancy ran for only one 15-min session five times a week. Voluntary exercise varied in late gestation, some animals did not run the day before parturition while others completed the schedule until parturition. Mothers did not exercise while nursing.

F1 Voluntary Exercise

CF1ex and MOF1ex rats were adapted in the same way, allowing them to be in contact with the rodent wheel 2 days in the week before PND 50. F1 rats ran 15 min which they always completed, followed by 15-min rest and a second 15-min run 5 days per week for 2 months (PND 50–PND 110). The last bout of exercise took place 24 h prior tissue collection.

F1 Sampling

At PND 110, following a 6-h fast, F1 rats were euthanized under general anesthesia with isoflurane exposure and rapid decapitation performed by trained personnel, experienced in using a rodent guillotine (Thomas Scientific, United States) between 12:00 and 14:00 h. Trunk blood was collected, and serum separated and preserved at –70°C until biochemical and hormonal analysis. Visceral fat depots located inside the thorax (mediastinal) and abdomen (omental, perirenal, retroperitoneal, epididymal, periovarian, perivesical and parametrial) were excised and weighed. Adiposity index (AI) was calculated as 100 × total adipose tissue (g)/body weight (g). The retroperitoneal fat pad was fixed in 10% paraformaldehyde, dehydrated and paraffin-embedded (Vankelecom, 2009).

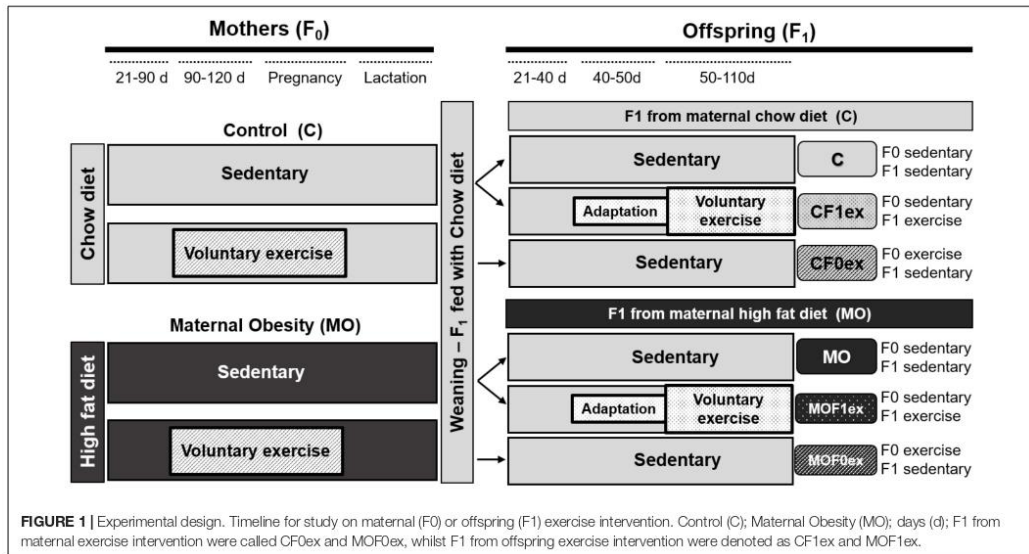
F1 Cross-Sectional AS

A total of 5 μm thickness paraffin-embedded retroperitoneal fat sections were mounted on poly-L-lysine pre-coated slides. After deparaffinization and rehydration slides were stained with hematoxylin and eosin (Cardiff et al., 2014). We analyzed at least 25 different cells per animal, using an Olympus BX51 light microscope (Melville, NY, United States) at 20× magnification. AS was measured manually by delimiting the adipocyte cross-sectional area in digital images using AxioVisio LE software real 4.8 version (Zeiss® copyright 2006–2010 Stuttgart-Germany) in at least 180 cells per group corresponding to an average of 25 cells per animal. AS was reported as the area obtained in μm². All histological measurements were performed by an observer blinded to the nature of the tissue source.

Characterization of Offspring AS Distribution by Different Statistical Approaches

AS Central Tendency and Data Distribution

Mean and median AS differences among groups were compared. In addition, AS data from all animals were visualized in grouped scatter plots and data dispersion analyzed by plotting the median vs. interdecile range.



AS Distribution Comparisons

Data distribution differences in AS were assessed by statistical comparison of their cumulative distributions.

AS Gamma Distribution Modeling

Normal distribution was evaluated using the AS sample mean and standard deviation. Since a cross-sectional view of adipose tissue emulates a Poisson-Voronoi diagram (Figure 2A) and the AS in a histological slide (Figure 2B) show an asymmetric distribution (Figure 2C).

Histograms of AS relative frequency with area intervals, approximated by the Sturges rule (Scott, 2009) of $500 \mu\text{m}^2$, (i.e., 0–500 μm^2 , 501–1,000 μm^2 , 1,001–1,500 μm^2 ... until the maximal observed area interval), were overlaid with their corresponding gamma probability density function. The determination coefficient (R^2) was calculated for theoretical normal and gamma quantiles by Q-Q plot analyses. Shape (mean/SD)² and scale [(SD)²/mean] were estimated individually for each rat, to calculate the small and large AS proportions.

Estimation of Small and Large AS Proportions

Small and large adipocyte cut-off points were defined, respectively, by the 10th and 90th percentile of the gamma distribution of the C group and analyses by non-parametric comparisons.

Blood Measurements

Glucose and triglycerides (TG) were analyzed enzymatically in a Synchron CX auto analyzer (Beckman Coulter, Co.); insulin and leptin were determined by radioimmunoassay. Insulin Resistance Index (IRI) was calculated from $\text{IRI} = \text{glucose (mmol/L)} \times \text{insulin } (\mu\text{U/mL}) \times 22.5^{-1}$ (Vega et al., 2015).

Statistical Analysis

One male and one female per litter were chosen randomly to provide $n = 8$ rats per sex per group. Shape, rate, and scale parameter are reported as median with interquartile range. Body weight, AI and blood measurements are reported as mean \pm SEM.

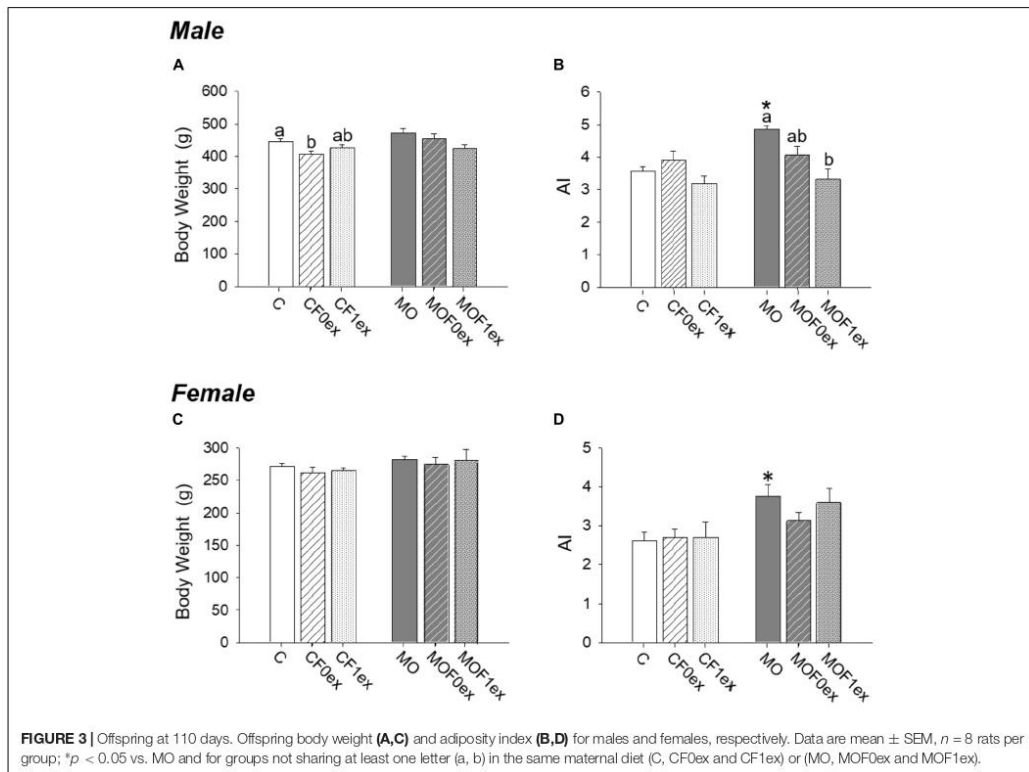
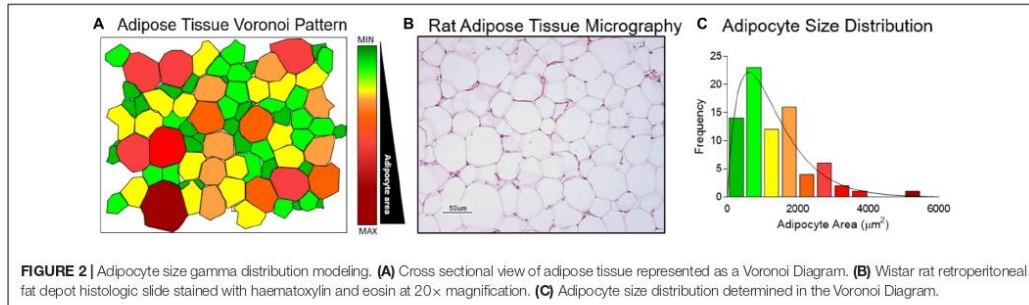
Adipocyte size cumulative distributions by the two sample Kolmogorov-Smirnov test (Graph Pad Prism 6.0) and the observed p -value was adjusted with the Bonferroni correction to counteract three sample simultaneous comparisons.

To assess the effect of F₀ diet on F₁ phenotype, we compared F₁ parameters of C and MO by Student's t -test for normally distributed data (body weight, AI and blood measurements) or the Mann-Whitney U test for non-normally distributed data (AS distribution). To assess effects of F₀ex and F₁ex within C and MO, we performed one-way ANOVA for normally distributed data and Kruskal-Wallis test for non-normally distributed data. AS dispersion of extreme values were determined by gamma distribution probability comparison. $p < 0.05$ was considered statistically different.

RESULTS

F1 Body Weight and AI at PND 110

F₁ body weight was similar between C and MO within males and females (Figures 3A,C). Male body weight was lower in CF₀ex than C but similar in CF₁ex. In the female F₁, F₀ex or F₁ex did not affect body weight (Figure 3C). AI was higher in MO when compared to C ($p < 0.05$) for both males and females (Figures 3B,D). AI was similar in all control groups in both males



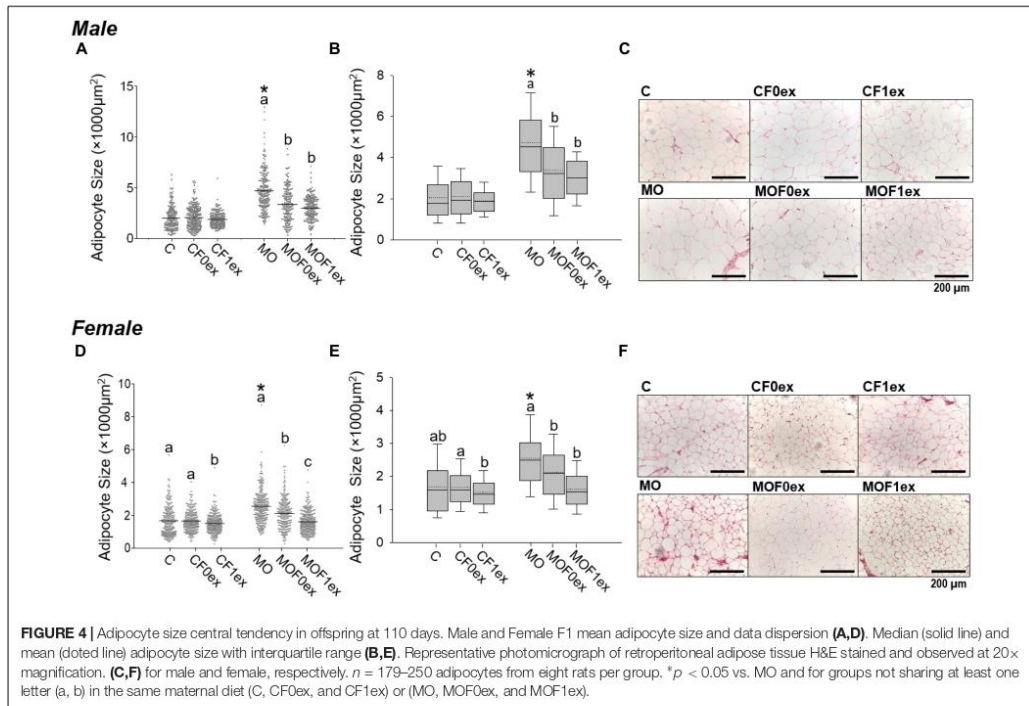
and females. MOF0ex AI was lower than MO (**Figure 3B**). No differences were observed in the female AI (**Figure 3D**).

Characterization of Offspring AS Distribution

AS Central Tendency and Data Distribution

Mean AS was higher in MO compared to C ($p < 0.05$) for both males and females. Mean AS was similar within C male

groups, but was lower in MOF0ex and MOF1ex males than MO (**Figure 4A**). Among C female groups, CF1ex AS mean was decreased compared to C and CF0ex. C and CF0ex were similar. In the MO female groups, both F0ex and F1ex intervention reduced mean AS in comparison with the MO group; however, a higher reduction in mean AS was observed in MOF1ex (**Figure 4D**). AS data failed both normality and homocedasticity tests. Comparison of means alone is therefore an



incorrect approach and is used here only to describe differences in means by one way ANOVA due to the generalized use of this approach in most studies. The scatter plot from C group male and female F1 showed more concentrated data; while male and female F1 from the MO groups show a bigger data spread. In addition, MOF0ex and MOF1ex reduced the data spread in both sexes (Figures 4A,D). A non-parametric comparison of AS showed that median AS was higher in MO when compared to C ($p < 0.05$) for both males and females. Median AS was similar within C male groups while MOF0ex and MOF1ex AS was decreased compared with the MO group (Figures 4B,C). In female C groups, AS was lower in the CF1ex group vs. CF0ex but was similar to C. In MOF0ex and MOF1 females AS was decreased compared with MO females (Figures 4E,F).

Among C groups, the plots of AS median vs. Interdecile Range showed that CF0ex predominantly reduced AS data dispersion in females but not in males (Figure 5). CF1ex mainly reduced data dispersion in males and females; whilst among MO groups, MOF0ex mostly reduced central tendency in both males and females and MOF1ex reduced AS central tendency in males and females; however, data dispersion was only reduced in males.

AS Cumulative Distribution Comparisons

Male and female C cumulative AS distributions were different ($p < 0.0001$) from MO (Figure 6). CF0ex and CF1ex male AS

distributions were different but similar to C. Male MO, MOF0ex and MOF1ex were different ($p < 0.05$). Female CF0ex and CF1ex were similar but different from C. MO, MOF0ex and MOF1ex were different ($p < 0.05$).

AS Distribution Modeling

In all groups, analysis of Q-Q plots showed that AS distribution fits to their theoretical normal and gamma distributions with R^2 values greater than 0.9. However, the linearity in gamma Q-Q plots was greater than normal Q-Q plots, while gamma Q-Q plots showed expected quantile, values were similar to the observed quantile values throughout distribution (Appendix Figure A1).

Gamma Distribution and Proportions of Small and Large Adipocytes

Figure 7 shows the histogram and the gamma distribution function for each group. Small and large adipocyte cut-off points were defined, respectively, by the 10th and 90th percentile of the gamma distribution of the C group, which was $778 \mu\text{m}^2$ for small and $3,587 \mu\text{m}^2$ for large adipocyte in C males and $702 \mu\text{m}^2$ for small and $2,852 \mu\text{m}^2$ for large adipocyte in C females. Decreased small and increased large adipocytes were observed in MO males and females compared to C. Lower proportions of small and large adipocytes were found in male CF1ex compared to CF0ex but similar to C. A higher proportion of small adipocytes was

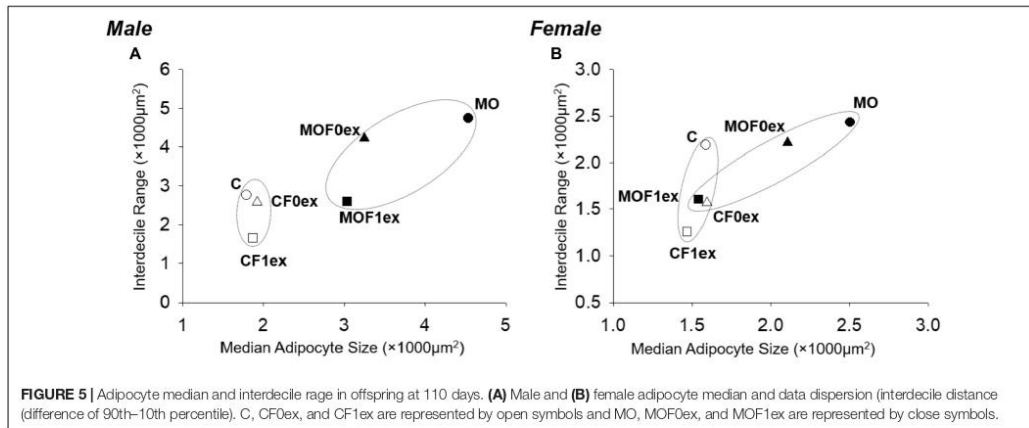


FIGURE 5 | Adipocyte median and interdecile range in offspring at 110 days. **(A)** Male and **(B)** female adipocyte median and data dispersion (interdecile distance (difference of 90th–10th percentile)). C, CF0ex, and CF1ex are represented by open symbols and MO, MOF0ex, and MOF1ex are represented by close symbols.

found in male MOF0ex and female MOF1ex compared to MO. A lower proportion of large adipocytes was observed in male and female MOF1ex compared to MO (Figure 7 and Table 1).

Blood Measurements

Increased leptin concentrations were observed in MO males and females compared to C ($p < 0.05$). However, within C and MO males, decreased leptin was observed in CF1ex and MOF1ex (Figure 8A). In C females F0ex and F1ex did not alter leptin concentrations. However, in MO females both MOF0ex and MOF1ex lead to lower leptin concentrations (Figure 8F).

Increased TG concentrations were observed in MO males and females compared to C ($p < 0.05$). Serum TG were similar among male C and MO groups (Figure 8B). In female TG concentrations were similar within C groups. In female MO groups, serum TG concentrations were only reduced in the MOF0ex (Figure 8G).

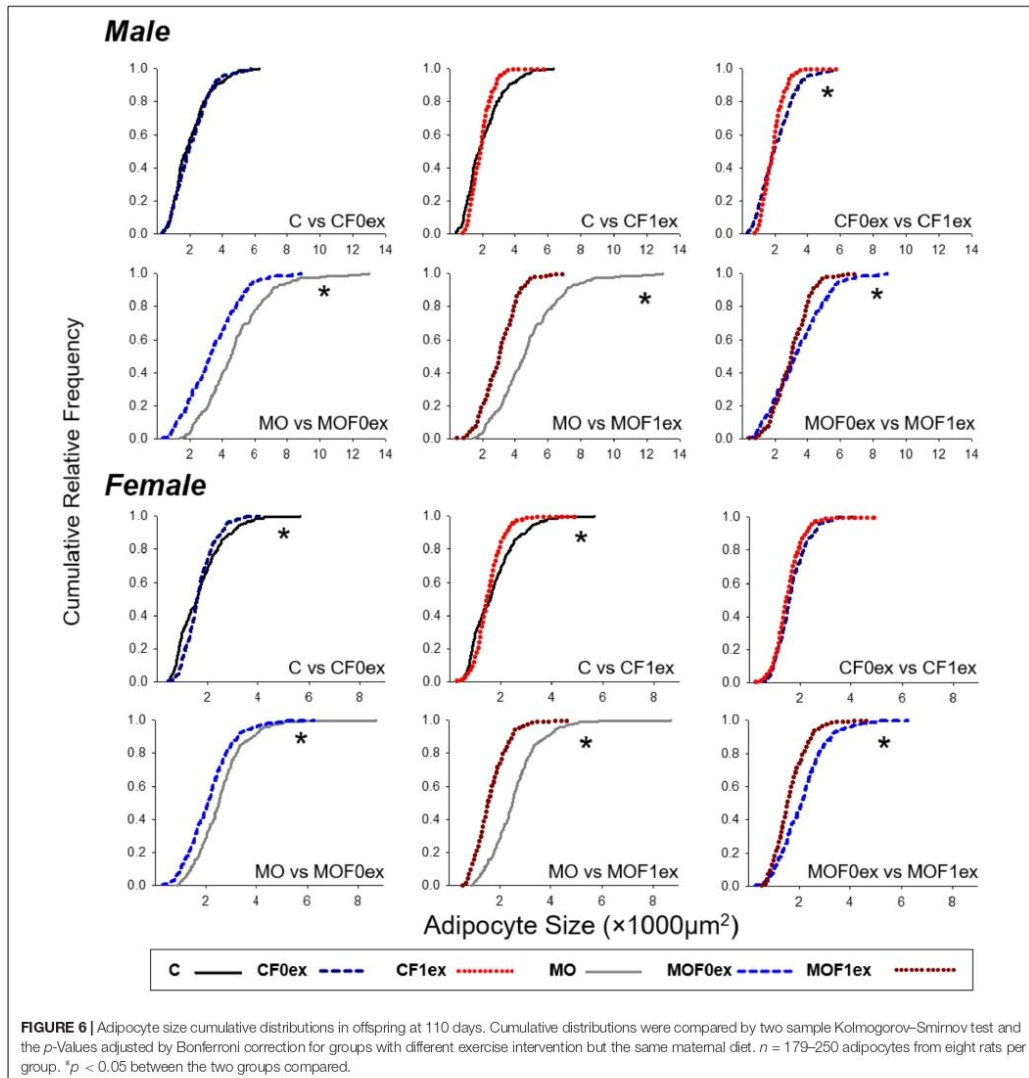
Male and female serum glucose was similar between C and MO, and within C groups and female MO groups. Male MO glucose was higher than MOF0ex and MOF1ex ($p < 0.05$) (Figures 8C,H). Male but not female MO serum insulin was higher than C ($p < 0.05$); no differences were found among C groups and MO groups in serum insulin (Figures 8D,I). IRI was increased in MO males compared with C ($p < 0.05$). Among C groups F0ex or F1ex did not modify IRI. Among MO groups, IRI was lower in MOF0ex vs. MO, while no difference was observed in the MOF1ex vs. MO, while no difference was observed in the MOF1ex when compared with MO and MOF0ex (Figure 8E). In females, no differences were observed in IRI in any group (Figure 8J).

DISCUSSION

Metabolic heterogeneity among obese and non-obese individuals, may be related to differences in AS distribution within different adipose tissue compartments (McLaughlin et al., 2014). These differences potentially help explain why individuals

with similar total adiposity exhibit dissimilarities in insulin sensitivity (McLaughlin et al., 2004). In the present study, we compared effects on AS of F0 and F1 exercise in young adult F1 of control and obese mothers. The results show that F0 and F1 exercise result in different beneficial metabolic profiles and several dissimilar AS distribution patterns.

It is known that increased AS and number are associated with the manner in which different metabolic states affect adipocyte metabolism (Garaulet et al., 2006; Bjorndal et al., 2011; Fang et al., 2015). Thus, precise methods to identify and quantify adipocyte characteristics are of great scientific and clinical interest. The discrepancy between parametric and non-parametric statistical analyzes of AS and variability indicates a need for development of appropriate methods. For example, methods should include analysis of extreme sizes (very small and large adipocytes). This consideration is often lacking in conventional approaches that consider small and large adipocytes as outliers rather than functionally significant data with important physiological implications. Adipocytes do not divide after preadipocyte differentiation (Scott et al., 1982). Very small AS is associated with preadipocyte differentiation into new adipocytes, whilst large sizes are related to fat accumulation in mature adipocytes (Welte, 2015). The quantification of new adipocytes together with the evaluation of lipid accumulation in mature adipocytes provides a better understanding of metabolic implications of variation in adipose tissue. Fat tissue can be expanded by both hypertrophy and hyperplasia. The balance between these two mechanisms is a major factor determining the final outcome in lipid storage homeostasis. In the present study, we focused on retroperitoneal fat tissue because in rats this fat compartment is expanded by a balance of hyperplasia (58%) and hypertrophy (42%) this is more balanced than other depots. In inguinal fat hyperplasia (65%) predominates while in mesenteric and epididymal depots hypertrophy accounts for 83 and 64%, respectively (DiGirolamo et al., 1998). In addition, increased retroperitoneal fat is associated with glucose and lipid

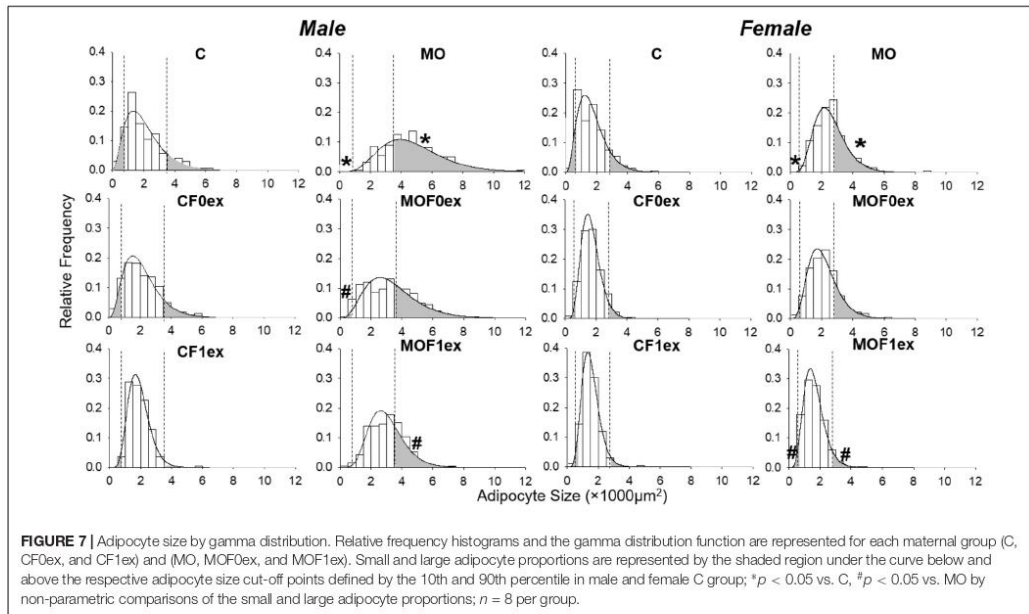


metabolic dysregulation (Matsuzawa et al., 1994; Gabriely et al., 2002).

Adipocyte size shows wide variance and data clustering in the present study since the mean value is larger than the median as a result of an increase in the proportion of large cells. As previously reported, this finding best fits to a gamma distribution (Lenz et al., 2016). Gamma distribution has been used to model waiting times and many other phenomena in social, biological, and physical sciences and is frequently used to describe continuous

variables that only take positive values such as, absolute distance, area or volume (Duyckaerts et al., 1994; Reese and Keeley, 2015). The asymmetric distribution of AS is due to the fact that adipocytes that reach a critical size provide signals to neighboring preadipocytes to divide and differentiate (Faust et al., 1978). These paracrine signals can stimulate or inhibit adipogenesis (MacDougald and Mandrup, 2002).

Our results confirm differences between C and MO in leptin, TG, IRI and AS distribution in male and female

**TABLE 1** | Small and large adipocyte size proportions.

Experimental Group	Male		Female	
	Small adipocytes ($\leq 778 \mu\text{m}^2$)	Large adipocytes ($\geq 3,587 \mu\text{m}^2$)	Small adipocytes ($\leq 702 \mu\text{m}^2$)	Large adipocytes ($\geq 2,852 \mu\text{m}^2$)
C	10%	10%	10%	10%
MO	0.1%*	68.6%*	0.4%*	38.9%*
MOF0ex	1.2%#	38.5%	2.3%	19.7%
MOF1ex	0.2%	27.1%#	4.2%#	4.4%#

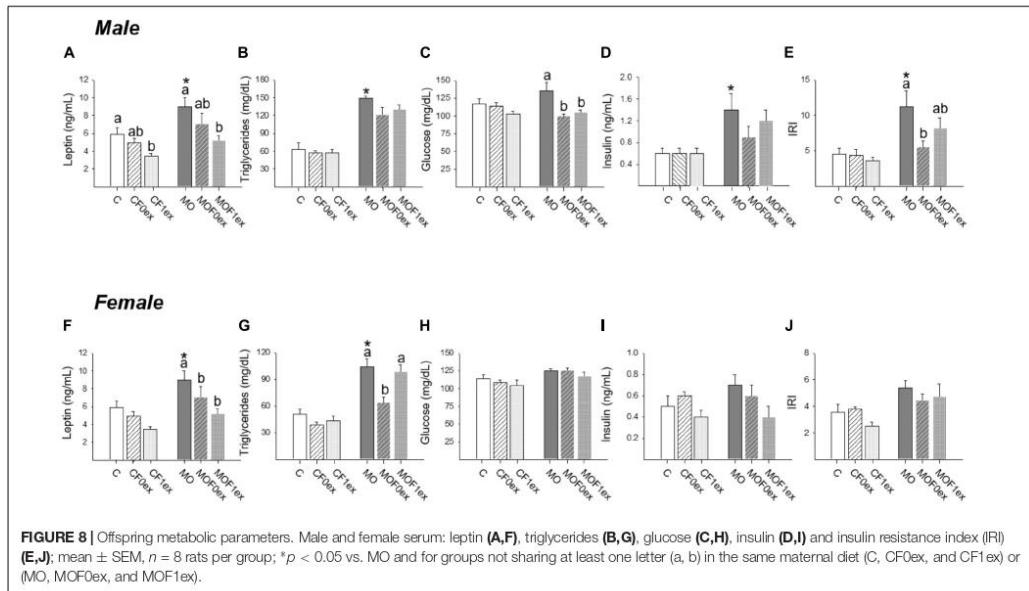
Small and large adipocyte cut-off points were defined, respectively, by the 10th and 90th percentile of the gamma distribution of the C group and analyses by non-parametric comparisons. * $p < 0.05$ vs. C; # $p < 0.05$ vs. MO; $n = 8$ per group.

F1. F0 and F1 exercise conferred different metabolic benefits on F1. The need to undertake more sophisticated analyses of AS is shown by the fact that when using simple median and mean analytic approaches, all groups of male and female controls are similar. However, differences can be shown between C and MO (Samuelsson et al., 2008; Zambrano et al., 2010; Borengasser et al., 2013). The limitation of using this approach is that the two different exercise interventions show similar outcomes compared with their respective controls. However, cumulative distribution analysis demonstrated differences between F0ex and F1ex in C and MO. The novel feature of the gamma distribution analysis we have performed is the evaluation

of extreme AS values which can't be analyzed by median comparisons.

Asymmetry in AS distribution is an important consequence of adipocyte proliferation and differentiation, since small adipocytes are directly linked to an increased rate of adipocyte proliferation and large adipocytes are associated with an increased lipid storage capacity. MO decreased asymmetry compared to C, but MOF0ex increased asymmetry. An asymmetric distribution to greater numbers of small adipocytes as observed in C groups can be interpreted as a better regulation of lipid storage homeostasis than seen in MO. MOF0ex increased the proportion of small cells and increased the proportion of large cells. These changes were accompanied by reduced male IRI and female TG. MO loss of asymmetry was due to both a decrease in small and an increase in large adipocytes which was corrected by both exercise interventions and associated with reduction of F1 serum leptin. In both MO and C, F1ex decreased data dispersion in the presence of lower leptin levels including in the male CF1ex.

Regulation of AS and its distribution in the retroperitoneal adipose tissue as a result of in utero over nutrition likely involves several maternal physiological factors such as preexisting maternal obesity, maternal western diet, and varying degrees of maternal glucose intolerance, which very often are associated to increased offspring birthweight (Desai et al., 2013). As reported previously, voluntary exercise intervention in obese mothers, results in similar F1 birthweight among C and MO of sedentary and exercise mothers, even if F0 MO females at breeding presented higher serum levels of leptin, cholesterol, TG, insulin,



glucose, IRI compared to C, and F0 exercise improved them (Vega et al., 2015).

The present study shows that F0 and F1 exercise have positive effects on F1 metabolism that has been programmed by MO. However, the changes that occur in AS are different. F0ex decreases large adipocytes and increases small adipocytes in comparison with MO. F1 exercise in contrast decreases the proportion of large cells more than F0ex but has no effect on the proportion of small cells. One potential explanation is that while exercise occurs during programming in F0ex, in F1 ex the consequences of programming have already been established. However, it is clear that F1 exercise does have beneficial effects. In addition, our data show F1 sexual dimorphism in programming by MO as well as F0 and F1 exercise responses. Men frequently achieve greater body weight and fat mass losses in response to lifestyle interventions than women (Aadland et al., 2014). Thus gender-specific prevention strategies are needed to increase the chance of successful weight loss to prevent or delay the onset of metabolic complication and improve life course health.

CONCLUSION

Several factors such as F0 and F1 diet and physical activity and F1 gender modify different aspects of AS distribution. To date outcomes have generally been analyzed by common statistical methods that do not include analyzes of extreme AS which characterize different phenotypes. The differences we have documented in AS distribution likely represent variation in

visceral fat adipogenesis regulation, which can be programmed during critical windows of development.

The present study focused on visceral adipose tissue. Similar analyses need to be performed on regulation of AS distribution within other adipose tissue compartments. F0 and F1 exercise were beneficial in F1 metabolism by different mechanism with sex specific effects.

The methods reported here need to be applied in future studies in different experimental species to establish the correlation between AS distribution in visceral adipose tissue and the many specific factors that regulate adipose tissue development and maintenance, e.g., adipokines, glucocorticoids and others steroid hormones (Mohamed-Ali et al., 1998; Sarantopoulos et al., 2017). They will also help determine life course efficacy of interventions designed to prevent and/or recuperate adverse developmental programming outcomes.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this manuscript will be made available by the authors, without undue reservation, to any qualified researcher.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CI researched the data, designed the study, and wrote the manuscript. MV-M, JL-C, LR-C, GR-G, and CB researched the data. PN prepared the manuscript. EZ designed the study and prepared the manuscript.

FUNDING

EZ was supported by CONACyT—155166 and the Newton Fund RCUK-CONACyT (Research Councils UK—Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) 1000/726/2016 FONCICYT/49/2016.

REFERENCES

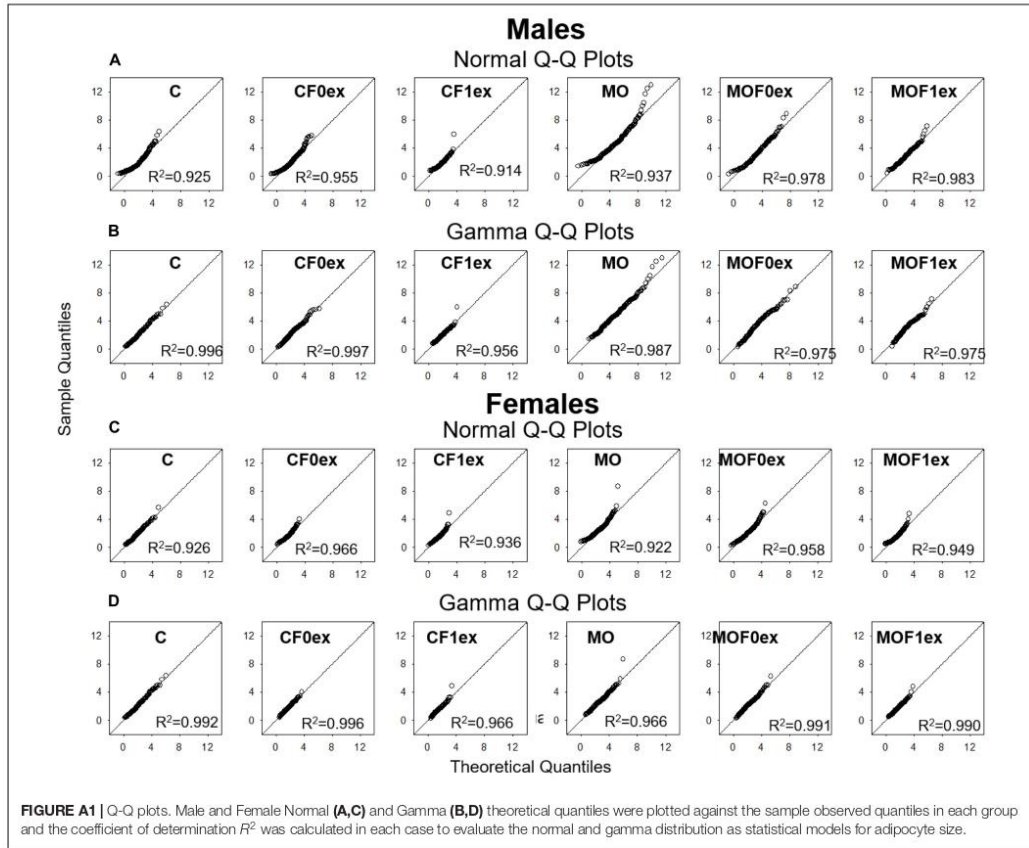
- Aadland, E., Jepsen, R., Andersen, J. R., and Anderssen, S. A. (2014). Differences in fat loss in response to physical activity among severely obese men and women. *J. Rehabil. Med.* 46, 363–369. doi: 10.2340/16501977-1786
- Ali, A. T., Hochfeld, W. E., Myburgh, R., and Pepper, M. S. (2013). Adipocyte and adipogenesis. *Eur. J. Cell Biol.* 92, 229–236. doi: 10.1016/j.ejcb.2013.06.001
- Almeida, M. M., Dias-Rocha, C. P., Souza, A. S., Muros, M. F., Mendonca, L. S., Pazos-Moura, C. C., et al. (2017). Perinatal maternal high-fat diet induces early obesity and sex-specific alterations of the endocannabinoid system in white and brown adipose tissue of weanling rat offspring. *Br. J. Nutr.* 118, 788–803. doi: 10.1017/S000714517002884
- Baik, M., Jeong, J. Y., Vu, T. T., Piao, M. Y., and Kang, H. J. (2014). Effects of castration on the adiposity and expression of lipid metabolism genes in visceral fat depots of Korean cattle. *Livestock Sci.* 168, 168–176. doi: 10.1016/j.livsci.2014.08.013
- Bautista, C. J., Rodriguez-Gonzalez, G. L., Morales, A., Lomas-Soria, C., Cruz-Perez, F., Reyes-Castro, L. A., et al. (2017). Maternal obesity in the rat impairs male offspring aging of the testicular antioxidant defence system. *Reprod. Fertil. Dev.* 29, 1950–1957. doi: 10.1071/RD16277
- Berends, L. M., Fernandez-Twinn, D. S., Martin-Gronert, M. S., Cripps, R. L., and Ozame, S. E. (2013). Catch-up growth following intra-uterine growth-restriction programmes an insulin-resistant phenotype in adipose tissue. *Int. J. Obes.* 37, 1051–1057. doi: 10.1038/sj.ijo.2012.196
- Berry, D. C., Stenesen, D., Zeve, D., and Graff, J. M. (2013). The developmental origins of adipose tissue. *Development* 140, 3939–3949. doi: 10.1242/dev.080549
- Berry, R., Church, C. D., Gericke, M. T., Jeffery, E., Colman, L., and Rodeheffer, M. S. (2014). Imaging of adipose tissue. *Methods Enzymol.* 537, 47–73. doi: 10.1016/B978-0-12-411619-1.00004-5
- Bjorndal, B., Burri, L., Staalesen, V., Skorve, J., and Berge, R. K. (2011). Different adipose depots: their role in the development of metabolic syndrome and mitochondrial response to hypolipidemic agents. *J. Obes.* 2011:490650. doi: 10.1155/2011/490650
- Borengasser, S. J., Zhong, Y., Kang, P., Lindsey, F., Ronis, M. J., Badger, T. M., et al. (2013). Maternal obesity enhances white adipose tissue differentiation and alters genome-scale DNA methylation in male rat offspring. *Endocrinology* 154, 4113–4125. doi: 10.1210/en.2012-2255
- Bradshaw, A. D., Graves, D. C., Motamed, K., and Sage, E. H. (2003). SPARC-null mice exhibit increased adiposity without significant differences in overall body weight. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 6045–6050. doi: 10.1073/pnas.1030790100
- Bringhenti, I., Schultz, A., Rachid, T., Bomfim, M. A., Mandarim-De-Lacerda, C. A., and Aguilá, M. B. (2011). An early fish oil-enriched diet reverses biochemical, liver and adipose tissue alterations in male offspring from maternal protein restriction in mice. *J. Nutr. Biochem.* 22, 1009–1014. doi: 10.1016/j.jnutbio.2010.08.013
- Camp, H. S., Ren, D., and Leff, T. (2002). Adipogenesis and fat-cell function in obesity and diabetes. *Trends Mol. Med.* 8, 442–447. doi: 10.1016/S1471-4914(02)02396-1
- Cardiff, R. D., Miller, C. H., and Munn, R. J. (2014). Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2014, 655–658. doi: 10.1101/pdb.prot073411
- Carrillo, B., Collado, P., Diaz, F., Chowen, J. A., Perez-Izquierdo, M. A., and Pinos, H. (2017). Physiological and brain alterations produced by high-fat diet in male and female rats can be modulated by increased levels of estradiol during critical periods of development. *Nutr. Neurosci.* 11, 1–11. doi: 10.1080/1028415X.2017.1349574
- Chen, H. C., and Farese, R. V. Jr. (2002). Determination of adipocyte size by computer image analysis. *J. Lipid Res.* 43, 986–989.
- Cohen, P., and Spiegelman, B. M. (2016). Cell biology of fat storage. *Mol. Biol. Cell* 27, 2523–2527. doi: 10.1091/mbc.E15-10-0749
- Desai, M., Beall, M., and Ross, M. G. (2013). Developmental origins of obesity: programmed adipogenesis. *Curr. Diab. Rep.* 13, 27–33. doi: 10.1007/s11892-012-0344-x
- DiGirolamo, M., Fine, J. B., Tagra, K., and Rossmann, R. (1998). Qualitative regional differences in adipose tissue growth and cellularity in male Wistar rats fed ad libitum. *Am. J. Physiol.* 274, R1460–R1467. doi: 10.1152/ajpregu.1998.274.5.R1460
- Duyckaerts, C., Godefroy, G., and Hauw, J. J. (1994). Evaluation of neuronal numerical density by Dirichlet tessellation. *J. Neurosci. Methods* 51, 47–69. doi: 10.1016/0165-0270(94)90025-6
- Elshenawy, S., and Simmons, R. (2016). Maternal obesity and prenatal programming. *Mol. Cell. Endocrinol.* 435, 2–6. doi: 10.1016/j.mce.2016.07.002
- Fang, L., Guo, F., Zhou, L., Stahl, R., and Grams, J. (2015). The cell size and distribution of adipocytes from subcutaneous and visceral fat is associated with type 2 diabetes mellitus in humans. *Adipocyte* 4, 273–279. doi: 10.1080/21623945.2015.1034920
- Faust, I. M., Johnson, P. R., Stern, J. S., and Hirsch, J. (1978). Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity. *Am. J. Physiol.* 235, E279–E286. doi: 10.1152/ajpendo.1978.235.3.E279
- Fukuda-Tsuru, S., Kakimoto, T., Utsumi, H., Kiuchi, S., and Ishii, S. (2014). The novel dipeptidyl peptidase-4 inhibitor teneligliptin prevents high-fat diet-induced obesity accompanied with increased energy expenditure in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 723, 207–215. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.11.030
- Gabriely, I., Ma, X. H., Yang, X. M., Atzmon, G., Rajala, M. W., Berg, A. H., et al. (2002). Removal of visceral fat prevents insulin resistance and glucose intolerance of aging: an adipokine-mediated process? *Diabetes* 51, 2951–2958.
- Garaulet, M., Hernandez-Morante, J. J., Lujan, J., Tebar, F. J., and Zamora, S. (2006). Relationship between fat cell size and number and fatty acid composition in adipose tissue from different fat depots in overweight/obese humans. *Int. J. Obes.* 30, 899–905. doi: 10.1038/sj.ijo.0803219
- Hirsch, J., and Gallian, E. (1968). Methods for the determination of adipose cell size in man and animals. *J. Lipid Res.* 9, 110–119.
- Jo, J., Gavrilova, O., Pack, S., Jou, W., Mullen, S., Sumner, A. E., et al. (2009). Hypertrophy and/or hyperplasia: dynamics of adipose tissue growth. *PLoS Comput. Biol.* 5:e1000324. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000324
- Jo, J., Guo, J., Liu, T., Mullen, S., Hall, K. D., Cushman, S. W., et al. (2010). Hypertrophy-driven adipocyte death overwhelms recruitment under prolonged weight gain. *Biophys. J.* 99, 3535–3544. doi: 10.1016/j.bpj.2010.10.009
- Jo, J., Shreif, Z., Gaillard, J. R., Arroyo, M., Cushman, S. W., and Periwai, V. (2013). "Mathematical models of adipose tissue dynamics," in *The Mechanobiology of Obesity and Related Diseases. Studies in Mechanobiology, Tissue Engineering and Biomaterials*, ed. B. D. Gefen (Cham: Springer).
- Jung, U. J., and Choi, M. S. (2014). Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 6184–6223. doi: 10.3390/ijms15046184
- Kajita, K., Mori, I., Hanamoto, T., Ikeda, T., Fujioka, K., Yamauchi, M., et al. (2012). Pioglitazone enhances small-sized adipocyte proliferation in subcutaneous adipose tissue. *Endocr. J.* 59, 1107–1114. doi: 10.1507/endocrj.EJ12-0259
- Laye, M. J., Rector, R. S., Warner, S. O., Naples, S. P., Perretta, A. L., Uptergrove, G. M., et al. (2009). Changes in visceral adipose tissue mitochondrial content

- with type 2 diabetes and daily voluntary wheel running in OLETF rats. *J. Physiol.* 587, 3729–3739. doi: 10.1113/jphysiol.2009.172601
- Lecoutre, S., Deracinois, B., Laborie, C., Eberle, D., Guinez, C., Panchenko, P. E., et al. (2016). Depot- and sex-specific effects of maternal obesity in offspring's adipose tissue. *J. Endocrinol.* 230, 39–53. doi: 10.1530/JOE-16-0037
- Lenz, M., Roumans, N. J., Vink, R. G., Van Baak, M. A., Mariman, E. C., Arts, I. C., et al. (2016). Estimating real cell size distribution from cross-section microscopy imaging. *Bioinformatics* 32, i396–i404. doi: 10.1093/bioinformatics/btw431
- MacDougald, O. A., and Mandrup, S. (2002). Adipogenesis: forces that tip the scales. *Trends Endocrinol. Metab.* 13, 5–11. doi: 10.1016/S1043-2760(01)00517-3
- Matsuzawa, Y., Shimomura, I., Nakamura, T., Keno, Y., and Tokunaga, K. (1994). Pathophysiology and pathogenesis of visceral fat obesity. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 24(Suppl.), S111–S116. doi: 10.1016/0168-8227(94)90236-4
- McLaughlin, T., Allison, G., Abbasi, F., Lamendola, C., and Reaven, G. (2004). Prevalence of insulin resistance and associated cardiovascular disease risk factors among normal weight, overweight, and obese individuals. *Metabolism* 53, 495–499. doi: 10.1016/j.metabol.2003.10.032
- McLaughlin, T., Lamendola, C., Coghlan, N., Liu, T. C., Lerner, K., Sherman, A., et al. (2014). Subcutaneous adipose cell size and distribution: relationship to insulin resistance and body fat. *Obesity* 22, 673–680. doi: 10.1002/oby.20209
- McLaughlin, T., Sherman, A., Tsao, P., Gonzalez, O., Yee, G., Lamendola, C., et al. (2007). Enhanced proportion of small adipose cells in insulin-resistant vs insulin-sensitive obese individuals implicates impaired adipogenesis. *Diabetologia* 50, 1707–1715. doi: 10.1007/s00125-007-0708-y
- Mohamed-Ali, V., Pinkney, J. H., and Coppack, S. W. (1998). Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 22, 1145–1158. doi: 10.1038/sj.ijo.0800770
- Murphy, J., Moulec, G., and Santosa, S. (2017). Factors associated with adipocyte size reduction after weight loss interventions for overweight and obesity: a systematic review and meta-regression. *Metabolism* 67, 31–40. doi: 10.1016/j.metabol.2016.09.009
- Parlee, S. D., Lentz, S. I., Mori, H., and MacDougald, O. A. (2014). Quantifying size and number of adipocytes in adipose tissue. *Methods Enzymol.* 537, 93–122. doi: 10.1016/B978-0-12-411619-1.00006-9
- Reese, B. E., and Keeley, P. W. (2015). Design principles and developmental mechanisms underlying retinal mosaics. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 90, 854–876. doi: 10.1111/brv.12139
- Reeves, P. G., Nielsen, F. H., and Fahey, G. C. 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. *J. Nutr.* 123, 1939–1951. doi: 10.1093/jn/123.11.1939
- Rodriguez, J. S., Rodriguez-Gonzalez, G. L., Reyes-Castro, L. A., Ibanez, C., Ramirez, A., Chavira, R., et al. (2012). Maternal obesity in the rat programs male offspring exploratory, learning and motivation behavior: prevention by dietary intervention pre-gestation or in gestation. *Int. J. Dev. Neurosci.* 30, 75–81. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2011.12.012
- Samuelson, A. M., Matthews, P. A., Argenton, M., Christie, M. R., McConnell, J. M., Jansen, E. H., et al. (2008). Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. *Hypertension* 51, 383–392. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.101477
- Santos, M., Rodriguez-Gonzalez, G. L., Ibanez, C., Vega, C. C., Nathanielsz, P. W., and Zambrano, E. (2015). Adult exercise effects on oxidative stress and reproductive programming in male offspring of obese rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 308, R219–R225. doi: 10.1152/ajpregu.00398.2014
- Sarantopoulos, C. N., Banyard, D. A., Ziegler, M. E., Sun, B., Shaterian, A., and Widgerow, A. D. (2017). Elucidating the preadipocyte and its role in adipocyte formation: a comprehensive review. *Stem Cell Rev.* 14, 27–42. doi: 10.1007/s12015-017-9774-9
- Scott, D. W. (2009). Sturges' rule. *Wiley Interdiscip. Rev.* 1, 303–306. doi: 10.1002/wics.35
- Scott, R. E., Hoerl, B. J., Wille, J. J. Jr., Florine, D. L., Krawisz, B. R., and Yun, K. (1982). Coupling of proadipocyte growth arrest and differentiation. II. A cell cycle model for the physiological control of cell proliferation. *J. Cell Biol.* 94, 400–405. doi: 10.1083/jcb.94.2.400
- Sen, S., and Simmons, R. A. (2010). Maternal antioxidant supplementation prevents adiposity in the offspring of Western diet-fed rats. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 59, 3058–3065. doi: 10.2337/db10-0301
- Skurk, T., Alberti-Huber, C., Herder, C., and Hauner, H. (2007). Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 1023–1033. doi: 10.1210/jc.2006-1055
- Tanemura, M. (2003). Statistical distributions of poisson voronoi cells in two and three dimensions. *Forma* 18, 221–247.
- Vankelecom, H. (2009). Fixation and paraffin-embedding of mouse tissues for GFP visualization. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2009:rot5298. doi: 10.1101/pdb.prot5298
- Vega, C. C., Reyes-Castro, L. A., Bautista, C. J., Larrea, F., Nathanielsz, P. W., and Zambrano, E. (2015). Exercise in obese female rats has beneficial effects on maternal and male and female offspring metabolism. *Int. J. Obes.* 39, 712–719. doi: 10.1038/ijo.2013.150
- Vega, C. C., Reyes-Castro, L. A., Rodriguez-Gonzalez, G. L., Bautista, C. J., Vazquez-Martinez, M., Larrea, F., et al. (2016). Resveratrol partially prevents oxidative stress and metabolic dysfunction in pregnant rats fed a low protein diet and their offspring. *J. Physiol.* 594, 1483–1499. doi: 10.1111/JP271543
- Wankhade, U. D., Thakali, K. M., and Shankar, K. (2016). Persistent influence of maternal obesity on offspring health: Mechanisms from animal models and clinical studies. *Mol. Cell. Endocrinol.* 435, 7–19. doi: 10.1016/j.mce.2016.07.001
- Welte, M. A. (2015). Expanding roles for lipid droplets. *Curr. Biol.* 25, R470–R481. doi: 10.1016/j.cub.2015.04.004
- Zambrano, E., Bautista, C. J., Deas, M., Martinez-Samaya, P. M., Gonzalez-Zamorano, M., Ledesma, H., et al. (2006). A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. *J. Physiol.* 571, 221–230. doi: 10.1113/jphysiol.2005.100313
- Zambrano, E., Martinez-Samaya, P. M., Rodriguez-Gonzalez, G. L., and Nathanielsz, P. W. (2010). Dietary intervention prior to pregnancy reverses metabolic programming in male offspring of obese rats. *J. Physiol.* 588, 1791–1799. doi: 10.1113/jphysiol.2010.190033
- Zambrano, E., Sosa-Larios, T., Calzada, L., Ibanez, C. A., Mendoza-Rodriguez, C. A., Morales, A., et al. (2016). Decreased basal insulin secretion from pancreatic islets of pups in a rat model of maternal obesity. *J. Endocrinol.* 231, 49–57. doi: 10.1530/JOE-16-0321

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Ibáñez, Vázquez-Martínez, León-Contreras, Reyes-Castro, Rodríguez-González, Bautista, Nathanielsz and Zambrano. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

APPENDIX





A High Fat Diet during Adolescence in Male Rats Negatively Programs Reproductive and Metabolic Function Which Is Partially Ameliorated by Exercise

OPEN ACCESS

Edited by:

Ran-Shan Ge,
Wenzhou Medical University, China

Reviewed by:

Seido Takae,
St. Marianna University School of
Medicine, Japan
Nalini Mahajan,
Mother & Child Hospital, India

*Correspondence:

Kesia Palma-Rigo
kesiapalma-rigo@hotmail.fr

† These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Reproduction,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 31 July 2017

Accepted: 30 September 2017

Published: 02 November 2017

Citation:

Ibáñez CA, Erthal RP, Ogo FM,
Peres MNC, Vieira HR, Conejo C,
Tófolo LP, Francisco FA, da Silva
Silveira S, Malta A, Pavanello A,
Martins IP, da Silva PHO, Jacinto
Saavedra LP, Gonçalves GD,
Moreira VM, Alves VS, da Silva
Franco CC, Previáte C, Gomes FM,
de Oliveira Venci R, Dias FRS,
Armitage JA, Zambrano E,
Mathias PCF, Fernandes GSA and
Palma-Rigo K (2017) A High Fat Diet
during Adolescence in Male Rats
Negatively Programs Reproductive
and Metabolic Function Which Is
Partially Ameliorated by Exercise.
Front. Physiol. 8:807.
doi: 10.3389/fphys.2017.00807

Carlos A. Ibáñez^{1,2†}, Rafaela P. Erthal^{3†}, Fernanda M. Ogo³, Maria N. C. Peres², Henrique R. Vieira², Camila Conejo², Laize P. Tófolo², Flávio A. Francisco², Sandra da Silva Silveira², Ananda Malta², Audrei Pavanello², Isabela P. Martins², Paulo H. O. da Silva², Lucas Paulo Jacinto Saavedra², Gessica D. Gonçalves², Veridiana M. Moreira², Vander S. Alves², Claudinéia C. da Silva Franco², Carina Previáte², Rodrigo M. Gomes⁴, Renan de Oliveira Venci², Francielle R. S. Dias², James A. Armitage⁵, Elena Zambrano¹, Paulo C. F. Mathias², Glaura S. A. Fernandes^{3†} and Kesia Palma-Rigo^{2*†}

¹Reproductive Biology Department, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico, ²Laboratory of Secretion Cell Biology, Department of Biotechnology, Genetics and Cell Biology, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brazil, ³Laboratory of Toxicology and Reproductive Metabolic Disorders, Department of General Biology, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil, ⁴Laboratory of Endocrinology and Metabolism, Department of Physiological Sciences, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brazil, ⁵School of Medicine, Deakin University, Waurn Ponds, VIC, Australia

An interaction between obesity, impaired glucose metabolism and sperm function in adults has been observed but it is not known whether exposure to a diet high in fat during the peri-pubertal period can have longstanding programmed effects on reproductive function and gonadal structure. This study examined metabolic and reproductive function in obese rats programmed by exposure to a high fat (HF) diet during adolescence. The effect of physical training (Ex) in ameliorating this phenotype was also assessed. Thirty-day-old male Wistar rats were fed a HF diet (35% lard w/w) for 30 days then subsequently fed a normal fat diet (NF) for a 40-day recovery period. Control animals were fed a NF diet throughout life. At 70 days of life, animals started a low frequency moderate exercise training that lasted 30 days. Control animals remained sedentary (Se). At 100 days of life, biometric, metabolic and reproductive parameters were evaluated. Animals exposed to HF diet showed greater body weight, glucose intolerance, increased fat tissue deposition, reduced VO_{2max} and reduced energy expenditure. Consumption of the HF diet led to an increase in the number of abnormal seminiferous tubule and a reduction in seminiferous epithelium height and seminiferous tubular diameter, which was reversed by moderate exercise. Compared with the NF-Se group, a high fat diet decreased the number of seminiferous tubules in stages VII-VIII and the NF-Ex group showed an increase in stages XI-XIII. HF-Se and NF-Ex animals showed a decreased number of spermatozoa in the cauda epididymis compared with animals from the NF-Se group. Animals exposed to both treatments (HF and Ex) were similar to all the other groups, thus these alterations

induced by HF or Ex alone were partially prevented. Physical training reduced fat pad deposition and restored altered reproductive parameters. HF diet consumption during the peri-pubertal period induces long-term changes on metabolism and the reproductive system, but moderate and low frequency physical training is able to recover adipose tissue deposition and reproductive system alterations induced by high fat diet. This study highlights the importance of a balanced diet and continued physical activity during adolescence, with regard to metabolic and reproductive health.

Keywords: high fat diet, moderate exercise, glucose metabolism, obesity, reproductive system

INTRODUCTION

Obesity is a global health problem, which is related to a sedentary lifestyle and highly calorific diets, which are rich in simple sugars and fat. In the last 40 years the rates of obesity in reproductive-age men has increased, with 36.9% of the population classified as overweight or obese in 2013 (Ng et al., 2014). Obesity underlies impaired glucose metabolism but may also decrease male reproductive potential (McPherson and Lane, 2015). This may further affect gamete quality and impact upon the health of the developing fetus and subsequent offspring (McPherson et al., 2014). Furthermore, the comorbidities and consequences of obesity impose a huge economic burden to public health management, including costs of cardiometabolic diseases and infertility treatments.

It is suggested that obesity negatively impacts sperm function, even if this function does not render obese males infertile. Studies have shown that almost 80% of men that present to fertility clinics are classified as either overweight or obese (Bakos et al., 2011). Furthermore, obesity modifies the reproductive system in conjunction with diabetes in obese men (Kriegel et al., 2009). Increased adiposity may not be the sole driver of impaired reproductive function in obese males, with comorbidities such as Type 2 Diabetes also influencing reproductive health (McPherson and Lane, 2015). However, little is known about the relationship between these alterations and the factors that modulate or determine reproductive health in obese individuals.

Previous studies provide evidence that adult obesity, metabolic dysfunction and reproductive impairment may be programmed by insults during early phases of life (Armitage et al., 2004; McMillen and Robinson, 2005; Zambrano et al., 2014). This process of programming adult disease by modulating the environment encountered during development is termed the developmental origins of health and disease (DOHaD). Maternal obesity or maternal protein restriction both lead to altered testicular morphology and elevated oxidative stress in the offspring (Rodriguez-Gonzalez et al., 2014, 2015). Recently, we have reported that adolescence is another window for programming of metabolic dysfunction (de Oliveira et al., 2013). Adequate nutrition during adolescence is very important due the rapid physical, psychosocial, sexual, and cognitive maturation

Abbreviations: HF, high fat diet; NF, Normal fat diet; Ex, exercised animals; Se, sedentary animals; VO₂max, maximal oxygen consumption during exercise; DOHaD, developmental origins of health and disease; IvGTT, Intravenous glucose tolerance test; DSP, daily sperm production.

processes occurring at this life stage (Salam and Bhutta, 2015). Furthermore, in humans dietary behavior during adolescence appears to contribute to obesity, including low meal frequency, skipping breakfast, and a high consumption of sugar sweetened beverages (Moreno et al., 2010). The impact of obesity on pubertal timing has been well addressed in the literature (Santos et al., 2015). However, no studies have addressed the effect of obesity programmed during adolescence on the morphology of adult testis and sperm. Data from our group shows that exposure to a high fat diet during adolescence programs the development of obesity and subsequent deregulation of glucose metabolism (Gomes et al., 2016); however, it is not known whether this is associated with any impact upon reproduction system structure or function.

Several studies have reported the benefit of physical exercise to metabolism and control of obesity (Henriksen, 2002; Levin, 2005; Gaesser et al., 2011; Zouhal et al., 2013). Exercise has been considered an efficient stimulus to control body weight gain and metabolic dysfunction in organisms programmed to obesity (Andreazzi et al., 2009; Gomes et al., 2013). It has also been shown that impaired sperm quality and fertility potential in rat offspring from obese dams can be ameliorated by exercise performed during adulthood (Santos et al., 2015). We hypothesized that high fat diet exposure during adolescence induces long term dysfunction of the metabolic and reproductive systems but physical exercise ameliorates function. In this context, the present study aimed to investigate the effect of moderate physical training on reproductive system and metabolism of obese rats programmed by high fat (HF) diet during adolescence.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Model

Twenty-five-day-old Wistar male rats were supplied by the State University of Maringa central animal facility and maintained in the animal facility of the Laboratory of Secretion Cell Biology. Animals were group housed (five rats per cage), under controlled conditions (temperature: 22 ± 2°C; photoperiod: 07 h 00 min—19 h 00 min), with water and food provided *ad libitum* throughout the experimental period. Experimental assays were performed on 10 animals per group from 40 different litters, where n represents the litter number.

After 5 days of environmental adaptation, a group of 30-day-old animals were fed a high fat diet for 30 days (HF; 35%

lard; 5.817 kcal/g) (Barella et al., 2012). From 60 days of life onwards they were fed with a commercial diet (NF; 3.801 Kcal/g; AIN 93 M, Nuvital[®], Curitiba/ PR, Brazil). Control rats were fed with the commercial diet through the experimental protocol (NF; 3.060 Kcal/g; AIN 93 M, Nuvital[®], Curitiba/ PR, Brazil). At 60 days of life animals commenced a treadmill running adaptation protocol consisting of 5 sessions of low activity (defined as 55–65% of VO_{2max}) and then at 70 days an exercise training protocol that lasted 30 days, creating 4 groups: (1) animals exposed to normal fat (NF) diet that remained sedentary (NF-Se); (2) animals exposed to the NF diet and exposed to exercise training (NF-Ex); (3) animals exposed to the HF diet that remained sedentary (HF-Se), and (4) animals exposed to the HF diet and exercise training (HF-Ex) (Figure 1). At 100 days of life experimental data were collected.

All animal procedures were conformed with the federal laws in Brazil for experimental uses of animals and approved by the Ethical Committee for Animal Experiments of the Universidade Estadual de Maringá.

Moderate Treadmill Physical Training Protocol

Animals were trained, always in the morning, on a specialized treadmill for rodents (Panlab, Harvard Apparatus[®], Cornellà-Barcelona—Spain). Electric shocks (0.2 e 0.4 mA) were used as a stimulus to keep the animal moving on the treadmill (Brooks and White, 1978; Radahmadi et al., 2013). Initially animals were adapted to running in the treadmill at low speed, starting at 16 cm/s for 12 min in the first session and finishing at 20 cm/s for 20 min in the last session (5 sessions from 60 to 69 days of life). The formal training period consisted of exercise performed three times a week for 4 weeks (12 sessions from 70 to 98 days of life). Each session consisted of 2 min of warm-up at 16 cm/s followed by 40 min of exercise of moderate intensity and finally 2 min at 16 cm/s as a cool down period. Exercise of moderate intensity corresponded to a treadmill velocity that elicited between 55 and 65% of VO_{2max} and was adjusted to the value of final workload achieved in effort tests (average 50 cm/s). The intensity of the

training was confirmed at 70, 85, and 98 days of life using a maximum effort test (Tofolo et al., 2015).

Effort Test

At 30, 60, 70, 85, and 98 days of life, physical trained (Ex) animals performed an effort test to determine VO_{2max} utilizing a gas analyzer coupled to a hermetically sealed cage with an individual treadmill for rodents (Panlab, Harvard Apparatus[®], Cornellà-Barcelona—Spain). The test began with a warm up (5 min/10 cm/s/0° of inclination), followed by increments of 9 cm/s every 3 min until exhaustion of the animal; defined as when the animal was unable to keep the pace set by the treadmill (Ferreira et al., 2007; Tofolo et al., 2015). The final workload was considered to be the velocity at which animals were exhausted and were not able to maintain their running velocity. The VO_{2max} was the average of the last 30 s of O_2 consumption achieved before the effort test finished. VO_{2max} and energy expenditure were determined by Metabolism software (version V.2.2.01 for Windows, Panlab, Harvard Apparatus[®], Cornellà-Barcelona - Spain) in combination with a gas analyzer.

Body Weight Gain

Body weight was monitored once a week between 30 and 98 days of life.

Intravenous Glucose Tolerance Test (ivGTT)

A silicone cannula was implanted into the right jugular vein of 99-day-old rats under anaesthesia (ketamine/xylazine, 0.5 mg/100 g of body weight). The following day, an ivGTT was performed as previously described (de Oliveira et al., 2011). Briefly, after 12-h fasting, intravenous glucose (1 g/kg of bodyweight) was injected into the cannula. Blood samples (0.3 mL) were collected prior to the glucose load (0 min) and then at 5, 15, 30, and 45 min. A corresponding volume of saline (0.9%) was intravenously injected to maintain volume. Plasma was used to determine glycaemia by the glucose-oxidase technique (Gold Analisa[®] Belo Horizonte/MG, Brazil). Increases in total glycaemia were calculated, after subtracting fasting values, using the areas under the glycaemia curves for the 45 min of ivGTT.

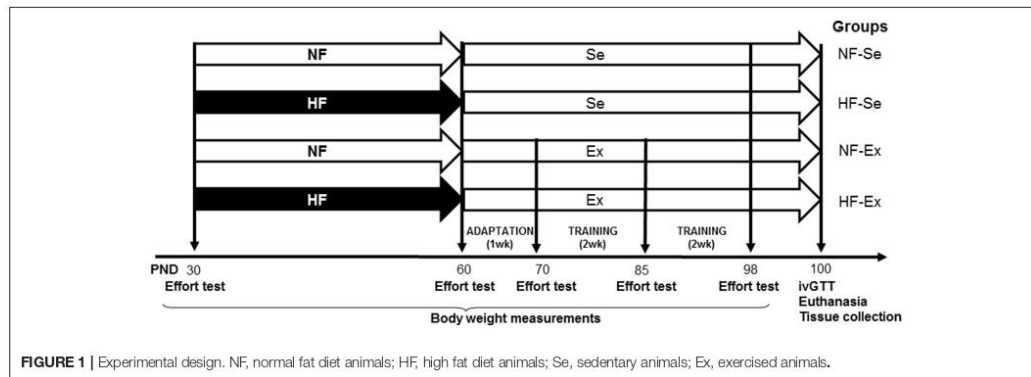


FIGURE 1 | Experimental design. NF, normal fat diet animals; HF, high fat diet animals; Se, sedentary animals; Ex, exercised animals.

Animals exposed to HF showed greater retroperitoneal, mesenteric and periepididymal fat deposition compared with NF rats ($\sim +40\%$, $+35\%$ and $+24\%$, respectively; $p_D < 0.01$; **Table 1**). Physically trained animals demonstrated lower retroperitoneal fat deposition compared with sedentary animals ($\sim -24\%$; $p_E < 0.05$; **Table 1**).

The mass of the gastrocnemius muscle was $\sim 20\%$ greater in HF animals compared with NF animals ($p_D < 0.01$; **Table 1**), but exercise did not affect this parameter. Soleus muscle weight was not affected by any factor.

Liver mass was approximately 8% greater in HF animals compared with NF animals ($p_D < 0.01$; **Table 1**).

Testicular mass was approximately 11.5% greater in HF animals compared with NF animals ($p_D < 0.001$; **Table 1**) and animals exposed to exercise demonstrated a 7% increase in testis weight compared with sedentary animals ($p_E < 0.05$; **Table 1**).

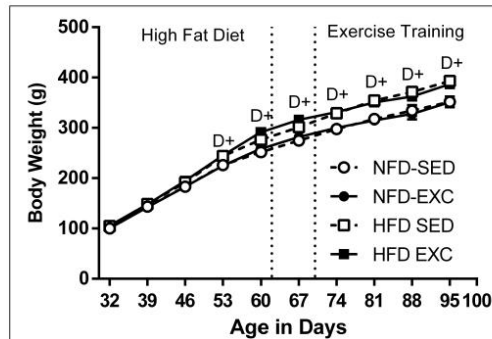


FIGURE 2 | Body Weight evaluated throughout experimental period ($n = 10$ per group). Values expressed as mean \pm SEM. $+P < 0.05$, for the probability based on analysis of variance. NF, normal fat diet animals; HF, high fat diet animals; Se, sedentary animals; Ex, exercised animals; D, effect of diet.

Reproductive System

Sperm Number, Daily Sperm Production, Sperm Transit Time Through Caput/Corpus Epididymal and Spermatic Morphology

Sperm count parameters both in testis and epididymis are shown on **Table 2**. The analyses of spermatic parameters showed that neither HF nor physical exercise were able to alter sperm number in the testis and DSP.

Sperm number of the epididymis and sperm transit time in the epididymal caput and corpus were unchanged. Conversely, animals exposed only to high fat diet (HF-Se) or physical exercises (NF-Ex) showed a decrease in the number of sperm and number of sperm per gram in the cauda epididymis compared with animals from NF-Se group (**Table 2**). The animals exposed to both treatments were similar to all groups.

In relation to spermatic morphology, HF-Ex animals showed reduced percentage of abnormal sperm compared with HF-SE (**Figure 3**).

Testicular Morphometric and Histopathological Analyses

Figures 4A–D shows representative photomicrograph of testis sections from the groups. We observed that HF-Se group showed a reduction in seminiferous epithelium height and seminiferous tubular diameters, which was prevented by physical training (**Figures 4H,I**). It is important to point out that exercise coupled with a normal fat diet had no influence on any of these parameters. When compared to NF-Se, histopathological testicular analysis (**Figure 4G**) demonstrated that the exposure to a high fat diet led to an increase in the number of abnormal seminiferous tubules which presented acidophilic and multinucleated cells along with disruption of the seminiferous epithelium (**Figures 4E,F**). Exercise was associated with a reduction of this damage in animals exposed to high fat diet in adolescence.

TABLE 1 | Biometric characteristics.

Biometric parameters (g/100 g BW)	Se		Ex		D	E	I
	NF	HF	NF	HF			
Retroperitoneal fat	1.13 \pm 0.12 ^{ab}	1.55 \pm 0.14 ^{ab}	0.80 \pm 0.07 ^a	1.25 \pm 0.12 ^b	+++	+	NS
Mesenteric fat	0.64 \pm 0.07 ^a	0.86 \pm 0.05 ^b	0.57 \pm 0.04 ^a	0.76 \pm 0.02 ^{ab}	+++	NS	NS
Periepididymal fat	1.07 \pm 0.09 ^a	1.39 \pm 0.08 ^b	1.12 \pm 0.06 ^{ab}	1.33 \pm 0.10 ^{ab}	++	NS	NS
Gastrocnemius muscle	0.52 \pm 0.03	0.63 \pm 0.03	0.53 \pm 0.03	0.63 \pm 0.05	++	NS	NS
Soleus muscle	0.046 \pm 0.002	0.051 \pm 0.003	0.048 \pm 0.005	0.047 \pm 0.003	NS	NS	NS
Liver	3.33 \pm 0.13 ^a	3.53 \pm 0.04 ^{ab}	3.35 \pm 0.09 ^a	3.71 \pm 0.04 ^b	++	NS	NS
Right testis	0.40 \pm 0.01 ^a	0.36 \pm 0.009 ^b	0.44 \pm 0.01 ^a	0.38 \pm 0.01 ^{ab}	+++	+	NS
Right epididymis	0.18 \pm 0.02	0.16 \pm 0.01	0.19 \pm 0.02	0.17 \pm 0.01	NS	NS	NS

Values expressed as mean \pm SEM. Different letters indicate groups that differ statistically ($p < 0.05$) based on Tukey's multiple comparisons test. $+P < 0.05$, $+++P < 0.001$ for the probability based on analysis of variance. NF, normal fat diet animals; HF, high fat diet animals; Se, sedentary animals; Ex, exercised animals; D, effect of diet; E, effect of exercise; I, interaction between diet and exercise, NS, no significant difference.

TABLE 2 | Sperm counts.

	Se		Ex	
	NF	HF	NF	HF
TESTIS				
Sperm number ($\times 10^6$)	134.8 \pm 8.3	114.3 \pm 16.4	148.7 \pm 13.7	135.1 \pm 12.0
Sperm number per gram ($\times 10^6$)	119.7 \pm 10.9	101.4 \pm 7.5	115.2 \pm 7.9	102.9 \pm 8.7
Daily sperm production ($\times 10^6$)	22.1 \pm 1.3	18.7 \pm 2.7	24.4 \pm 2.2	22.1 \pm 1.9
CAPUT AND CORPUS EPIDIDYMIS				
Sperm number ($\times 10^6$)	78.4 \pm 22.5	58.1 \pm 10.5	73.4 \pm 4.2	76.6 \pm 7.3
Sperm number per gram ($\times 10^6$)	305.3 \pm 82.5	219.4 \pm 41.7	294.4 \pm 17.8	272.2 \pm 32.2
Transit time (days)	3.7 \pm 1.0	3.1 \pm 0.6	3.3 \pm 0.5	3.3 \pm 0.4
CAUDA EPIDIDYMIS				
Sperm number in ($\times 10^6$)	130.5 \pm 2.6 ^a	78.3 \pm 15.0 ^b	78.8 \pm 14.3 ^b	85.1 \pm 3.1 ^{ab}
Sperm number per gram ($\times 10^6$)	745.4 \pm 20.6 ^a	389.8 \pm 62.8 ^a	416.2 \pm 95.7 ^a	458.2 \pm 31.4 ^a
Transit time (days)	6.3 \pm 0.3	3.9 \pm 0.6	3.5 \pm 0.7	3.4 \pm 0.3

Values expressed as mean \pm SEM. Kruskal–Wallis, with post-hoc Dunn test. ^{a,b}Different letters indicate groups that differ statistically ($p < 0.05$).

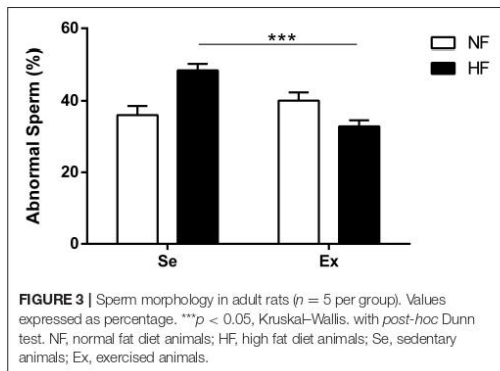


FIGURE 3 | Sperm morphology in adult rats ($n = 5$ per group). Values expressed as percentage. *** $p < 0.05$, Kruskal–Wallis, with post-hoc Dunn test. NF, normal fat diet animals; HF, high fat diet animals; Se, sedentary animals; Ex, exercised animals.

Spermatogenesis Kinetics

Table 3 shows that exposure to a high fat diet decreased the number of seminiferous tubules in stages VII–VIII irrespective of exercise status (compared with the NF-Se group). On the other hand, exercise in NF fed animals had an opposite effect; the NF-Ex group showed an increase in stages XI–XIII when compared to NF-Se group. The proportion of tubules containing stage I to VI and XIV were statistically similar among all experimental groups.

Epididymal Stereological Analysis and Histopathological Analysis

Animals from the NF-Ex group showed an increase in the proportion of stromal compartment of epididymal caput in

comparison with those from the NF-Se group (Table 4), however, animals exposed to the high fat diet did not differ statistically from NF-Se animals. Likewise, the proportion of stromal compartment in animals fed high fat diet did not differ statistically from NF-Ex group. In relation to epididymal cauda, the group HF-Ex presented a major proportion in luminal compartment and a reduction in the proportion of epithelium from animals of the same group in relation to NF-Se group. Histopathological analysis failed to indicate any variability between experimental groups.

Metabolism

Intravenous Glucose Tolerance Test (ivGTT)

During the ivGTT, a peak in glycaemia was observed 5 min after glucose injection, and euglycaemia was restored within approximately 35 min (Figure 5A). At the peak of the curves, HF rats exhibited approximately 20% greater blood glucose concentration compared with NF animals, which translated to a greater glycaemia area under the curve ($p_D < 0.001$; Figures 5A,B). Exercise did not affect the glycaemia in either NF and HF groups.

Effort Test

Two way ANOVA test shows a main effect of diet as animals exposed to the HF diet have reduced VO_{2max} and energy expenditure compared with NF animals (VO_{2max} and energy expenditure in Se: -9% and Ex: -27%, $p_D < 0.01$, Figures 5C,D). It was not observed a main effect of exercise in the VO_{2max} and energy expenditure ($p_E = 0.44$).

DISCUSSION

The major finding of the present study is that exposure to a high fat diet during adolescence lead to long-term changes in the reproductive system and metabolism of male rats, which may implicate reproductive and metabolic programming mechanisms (Metges, 2009; de Oliveira et al., 2013; Zambrano et al., 2014). Furthermore, a moderate intensity and low frequency moderate exercise training markedly improved reproduction markers in HF animals, by a mechanism largely independent of metabolic improvement. The present physical training protocol; low intensity, low frequency and short duration (30 days), may be too gentle to improve metabolism. However, the reproductive system appears to be more amenable to improvement at this level of physical activity. A more intense or more frequent physical exercise protocol (Santos et al., 2015) have been shown to induce both metabolic and reproductive rescue. It has been shown that the present protocol of physical exercise is able to ameliorate metabolic changes induced by a HF, when performed before the exposure to the dietary insult (Tofolo et al., 2015). Furthermore, physical training started earlier in life and performed until adulthood, concomitant with HF diet, promoted improvement of glucose and lipid homeostasis in adult animals compared with animals exposed to HF diet in the same conditions (Gomes et al., 2013).

Traditionally, there has been a great emphasis on the role of the fetal period in programming adult disease but fetal

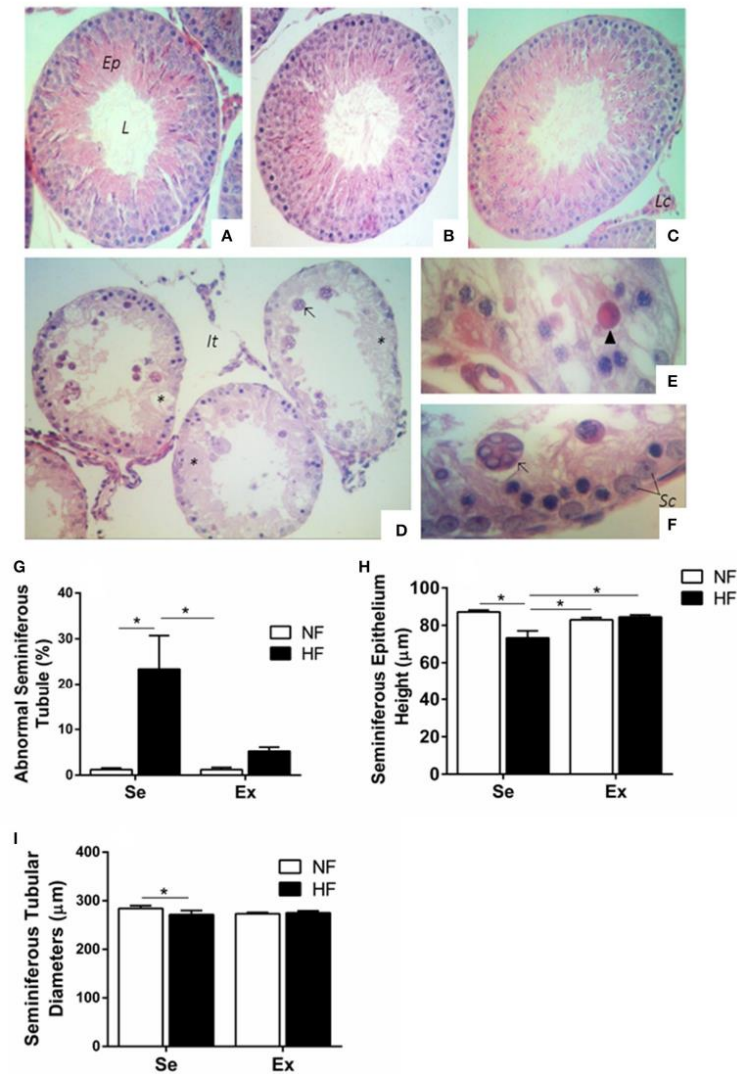


FIGURE 4 | Histopathological analysis of seminiferous epithelium in testis in adult rats ($n = 5$ per group). Photomicrograph of testis sections from NF-Se (A), NF-Ex (B), HF-Ex (C), and HF-Se (D–F) groups. (A–C) Observe the normal aspect of the seminiferous epithelium. (D) Note the presence of multinucleated cells in the lumen (arrow) and disruption of seminiferous epithelium (asterisk). (E) Acidophilic cell (head of arrow). (F) Shows greater magnification of multinucleated cell (arrow) of image (D). (G) abnormal seminiferous tubules. (H) Seminiferous epithelium height. (I) Seminiferous tubular diameters. NF, normal fat diet animals; HF, high fat diet animal; Se, sedentary animals; Ex, Exercised animals; L, lumen; Ep, epithelium; It, interstitial tissue; Lc, Leydig cells; Sc, Sertoli cells. Hematoxylin and eosin stain. Magnification $\times 100$ (A–D), $\times 400$ (E,F). Values expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$. Kruskal-Wallis test, with the *post-hoc* Dunn test. NF, normal fat diet animals; HF, high fat diet animals; Se, sedentary animals; Ex, exercised animals;

TABLE 3 | Spermatogenesis kinetics.

	Se		Ex	
	NF	HF	NF	HF
Stages I-VI	31.8 ± 1.02	35.6 ± 1.91	32.0 ± 1.48	37.0 ± 1.38
Stages VII-VIII	35.2 ± 1.07 ^a	26.6 ± 0.98 ^b	30.0 ± 2.02 ^{ab}	28.3 ± 1.57 ^b
Stages IX-XII	28.4 ± 1.29 ^a	32.2 ± 0.97 ^{ab}	34.2 ± 0.97 ^b	28.9 ± 0.61 ^a
Stage XIV	4.6 ± 0.92	5.6 ± 1.21	3.8 ± 0.49	5.7 ± 0.58

Values expressed as mean ± SEM. Kruskal-Wallis, with post-hoc Dunn test. ^{a,b} Different letters indicate groups that differ statistically ($p < 0.05$).

interventions are limited for obvious reasons. Previously, our group have identified other periods in life in which animals are susceptible to programming of diseases in adulthood (de Oliveira et al., 2013; Malta et al., 2015). Data from our group points that adolescence represents a window of susceptibility to programming. Exposure to a low protein or HF diet during adolescence programs cardiometabolic dysfunctions later in life (de Oliveira et al., 2013; Gomes et al., 2016). This, however is the first study to demonstrate the possibility of rescuing long term alterations in male reproductive system function caused by a dietary insult during adolescence with physical training. It is important to consider that adolescence is a period of intense neuroendocrine and reproductive changes, characterized by puberty and sexual development (Ebling, 2005; Salam and Bhutta, 2015), which contextualize the sensitivity of this phase of life and the present findings. It is well known that weight gain velocity increases and calories demand increases in the peripubertal period, which appear to affect puberty development. Indeed, obese adolescents demonstrate early puberty onset (Soliman et al., 2014). Furthermore, studies demonstrate that dietary patterns during adolescence have changed over the last 2–3 decades and affect body weight gain, which may contribute to overweight and obesity from this period of life onwards (Moreno et al., 2010).

The present study shows that consumption of HF induced significant alteration to testicular morphometric and histopathological analyses. A reduction in seminiferous epithelium height and seminiferous tubular diameter was observed in rats fed a high fat diet during adolescence only. Corroborating the data from our study, Erdemir et al. also showed a decrease in the number of normal seminiferous tubules of adult rats exposed to high fat diet for 10 weeks (Erdemir et al., 2012). In addition, a study by Liu et al. showed an increase in abnormal testicular structures, such as epithelial disruption, in 6 week old fat (20% fat) fed Sprague-Dawley rats (Liu et al., 2014). Conversely, we have shown previously that male Sprague-Dawley rats fed with HF (35% fat) from 21 until 90 days of life did not demonstrate abnormal seminiferous tubule morphology (Vigueras-Villasenor et al., 2011) suggesting that the dietary insult can affect the response to fat intake and exercise in a different way depending on the diet relative content of fat. A possible reason for these alterations is showed by Cano et al. (2008), whose study presented a reduction in levels of plasma testosterone after the male rats were exposed to HFD

(35% fat) during 68 days of treatment (Cano et al., 2008) which was similar to the present study. Knowing the relevance of testosterone levels, especially during puberty enabling male sexual development and spermatogenesis (Johnson et al., 2015), a reduction on these levels could explain a possible mechanism for altering previous parameters.

The finding that exercise is protective is also dependent on a number of factors, including the age at which the intervention is introduced. Adult male rats exposed to swimming exercise for 4 weeks showed significant reduction of seminiferous tubule diameter in relation to control group, contrasting with our findings (Manna et al., 2004). The swimming exercise applied by Manna et al. (2004) is more intense than the one used in the present study. Furthermore, the same authors reported a decrease in spermatogenic cells at different stages of spermatogenesis, which may suggest an alteration in spermatogenesis kinetics as per the observation in the present. Conversely, a model using adult mice exposed to running training for 14 months showed positive effects on mice testicular health with regard to improved complete number and type of cells in seminiferous tubule, increased sperm density and more abundant Sertoli cells compared with that observed in sedentary mice (Chigurupati et al., 2008). Our findings demonstrate that a low frequency, low intensity physical exercise ameliorates the impairment caused by HF exposure. Over again, alterations in testosterone levels can impair the normal seminiferous tubule development. Study of Palmer et al. showed that exercise in mouse fed a high-fat diet restore levels of testosterone (Palmer et al., 2012).

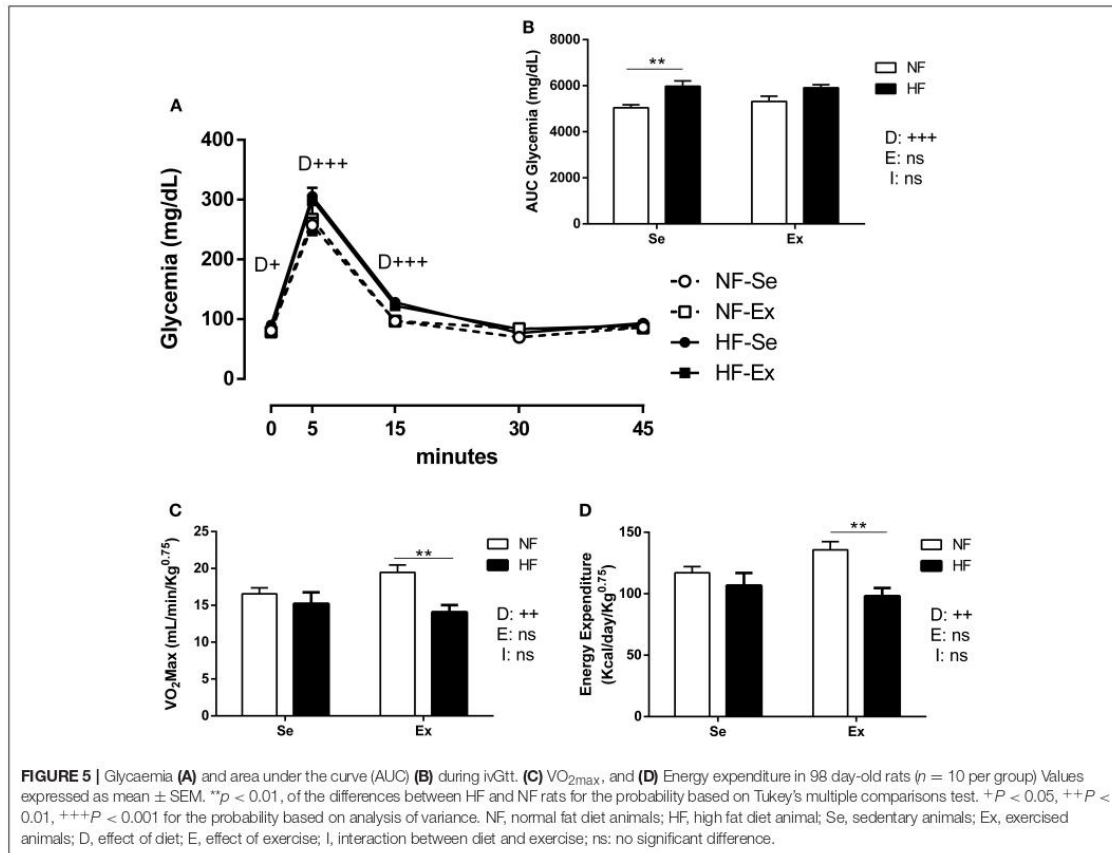
The present study showed that testicular function was not altered in relation to the daily sperm production, but sperm morphology after treatment, was altered. Consistent with our data, Mortazavi et al. also failed to observe differences in sperm count between rats (3 months old) fed with high fat diet (444 kcal/100 g) and normal diet (304 kcal/100 grams) for 12 weeks (Mortazavi et al., 2014). The same author demonstrated other spermatogenic parameters were affected by the high fat diet such as an observation of reduced viability, motility and normal spermatogenic morphology. A study in adult mice (Palmer et al., 2012) demonstrates that a high fat diet (21% kcal as fat for 10 weeks) reduced sperm motility and morphology and DNA damage but a forced swimming exercise intervention resulted in normalized sperm motility and morphology, besides reduces the sperm DNA damage of rats (8 weeks old). The same study showed the differences in testosterone levels, which can be related with our results showing a concomitant normalization of plasma testosterone levels and sperm morphology. The Palmer study reported normal sperm count in fat fed animals; a finding that is consistent with our current observation. Our results shows that, both the high fat diet and exercise, whether isolated or in combination, can impair the proportion of the stage of spermatogenesis, which can be deleterious to spermatogenesis in the long run.

It has previously been suggested that consumption of a high fat diet (40% of calories as fat for 12 weeks) results in decreased antioxidant enzyme expression and function, thereby leading to cellular dysfunction. Moreover, antioxidant capacity is normalized in fat fed animals that are also submitted to

TABLE 4 | Stereological analysis of caput and cauda epididymis.

	Se		Ex	
	NF	HF	NF	HF
CAPUT (2A)				
Stroma	24.1 [21.4–28.0] ^a	23.2 [21.1–28.4] ^a	27.4 [23.9–32.4] ^b	28.0 [19.8–31.2] ^{ab}
Lumen	47.0 [43.4–50.0] ^a	48.2 [41.7–51.2] ^a	45.2 [40.8–50.0] ^a	49.4 [35.9–54.2] ^a
Epithelium	28.9 [25.1–32.4] ^a	28.0 [24.5–30.6] ^a	25.6 [23.8–29.6] ^a	25.6 [20.1–34.8] ^a
CAUDA (5A/B)				
Stroma	22.9 [18.7–28.0] ^a	22.6 [19.3–26.8] ^a	25.9 [21.4–30.3] ^a	22.0 [18.6–26.8] ^a
Lumen	52.4 [44.5–58.9] ^{ab}	50.6 [44.2–54.0] ^a	46.7 [43.4–52.5] ^a	54.2 [49.4–64.0] ^b
Epithelium	25.6 [23.1–29.3] ^a	27.7 [23.9–30.3] ^a	26.8 [22.2–30.9] ^a	21.1 [12.0–26.3] ^b

Values expressed as median [Q1–Q3] from percentage. Kruskal–Wallis, with post-hoc Dunn test. ^{a, b}Different letters indicate groups that differ statistically ($p < 0.05$).



endurance exercise training protocols (Alhashem et al., 2014). Other studies show that animals fed a high fat diet demonstrated alterations in spermatid parameters associated with oxidative stress, including reduced sperm concentration, viability, motility and DNA integrity (Viguera-Villasenor et al., 2011; Chen

et al., 2013; Mortazavi et al., 2014). In another study, increased adiposity as well as decreased sperm quality and fertility was shown in old (450 day) male Wistar rat offspring born to obese mothers. Importantly, 4 months of regular voluntary physical activity (from 330 days of life onwards), lead to lower

adiposity index and an improved sperm quality and fertility. These beneficial effects were associated to decreased testicular oxidative stress biomarkers and increased sperm antioxidant activity found in exercised animals (Santos et al., 2015).

Epididymal tissue morphology demonstrated that the association between high fat diet and physical exercise impaired the normal development of both luminal and epithelial compartments of the epididymal cauda. Previous study have shown that epididymal regions respond in different ways after the same stimulus, with changes in some compartments of the epididymis caput and in others of the epididymis cauda induced by ethanol exposure during peripubertal period (Paula Franco Punhagui et al., 2016). Despite of the alterations described, the organ function was not impaired since the spermatid transit time was unaltered within the caput / corpus or cauda epididymis. Our results corroborate with the study by Fernandez et al. which showed that sperm numbers in the caput/corpus was similar between animals fed a HFD for 15 weeks and controls (Fernandez et al., 2011).

There is no consensus statement regarding any beneficial or deleterious effects of physical exercise/sport on reproductive performance (Du Pressis et al., 2011). In fact, exercise has been shown to induce diverse effects on the reproductive system which vary with exercise type, intensity, time, order or characteristics of the physical exercise. For example, prolonged exhaustive exercise in men may lead to adverse effects on fertility, characterized by abnormal sperm morphology (Arce et al., 1993; Vaamonde et al., 2009). Interestingly, individuals who started extensive physical training at or around the time of puberty may be more susceptible to reproductive dysfunction (Vaamonde et al., 2016). In the present study, animals performed moderate and low frequency exercise for a short period, which was designed to avoid any adverse effects of exhaustive exercise on fertility. Therefore, the positive effect on reproductive function indicates that moderate exercise is a potential non-pharmacological treatment to improve reproductive function in obese individuals.

The present study also shows that animals exposed to HF and exercised showed an attenuation of fat deposits (mesenteric and retroperitoneal fats) which can be associated with protection of reproductive system which may suggest that adiposity levels are involved in the impairment of sperm function. Alternatively, Palmer et al. have shown that low intensity swimming training in mice improves reproductive system without affecting adiposity in obese animals, which suggest that adiposity itself is not the sole determinant in the impaired sperm function (Palmer et al., 2012). The different findings may be species or exercise dependent. Moreover, it may not be adiposity *per se* but rather glucose tolerance, which predicts sperm function. Blood glucose concentrations do correlate with the percentage of capacitated or non-capacitated sperm (Palmer et al., 2012). Accordingly, our present data show that animals exposed to HF during adolescence demonstrate obesity which is associated to glucose intolerance and dysfunction of reproductive system. Both hyperinsulinemia and hyperglycemia may underlie of altered sperm function, which occurs independent of adiposity

(McPherson and Lane, 2015). Discordance between metabolism and adiposity in determining of reproductive dysfunction was also observed in the present study, as the moderate exercise improved adiposity index and sperm function without affecting glucose tolerance.

Very few studies have addressed adolescence as a period of plasticity in terms of developmental programming but the present study provides clear evidence that consumption of high fat diet during this period can have long-term effects on reproductive function. To conclude, HF exposure during adolescence induces to long term obesity, altered glucose metabolism and causes adverse effects on the male reproductive system, which may contribute to reproductive and metabolic programming. Furthermore, low frequency moderate exercise improves the reproductive deficit induced by this HF, which points to the importance of exercise as a potential non-pharmacological intervention to treat infertility in obese individuals programmed since adolescence.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CI and RE contributed to the design of the study, acquisition, analysis and interpretation of data; revised critically the draft for important intellectual content; give final approval of the version to be published; and agree to be accountable for all aspects of the work. MP, HV, CC, LT, FF, FD, SS, AM, AP, IM, PS, LJ, FO, GG, VM, CE, VA, CP, RG, RV contributed with the acquisition; revised critically the draft for important intellectual content; give final approval of the version to be published; and agree to be accountable for all aspects of the work. JA and EZ participated in the interpretation of the data for the work; revised critically the draft for important intellectual content; give final approval of the version to be published; and agree to be accountable for all aspects of the work. PM, GF and KP conceived the study and participated in its design and coordination; drafted the manuscript; give final approval of the version to be published; and agree to be accountable for all aspects of the work.

FUNDING

This work was supported by grants from the Brazilian Research National Foundation: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ (grant number 500698/2013-9, 400762/2014-5) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes; and grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México and Programa Latinoamericano para la Investigación en Salud Sexual y Reproductiva (PLISSER). Programa Latinoamericano para la Investigación en Salud Sexual y Reproductiva (PLISSER).

ACKNOWLEDGMENTS

CI is a graduate student from Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México and is recipient of a CONACyT fellowship.

REFERENCES

- Alhashem, F., Alkhateeb, M., Sakr, H., Alshahrani, M., Alsunaidi, M., Elrefaay, H., et al. (2014). Exercise protects against obesity induced semen abnormalities via downregulating stem cell factor, upregulating Ghrelin and normalizing oxidative stress. *EXCLI J.* 13, 551–572.
- Andreazzi, A. E., Scomparin, D. X., Mesquita, F. P., Balbo, S. L., Gravena, C., De Oliveira, J. C., et al. (2009). Swimming exercise at weaning improves glycemic control and inhibits the onset of monosodium L-glutamate-obesity in mice. *J. Endocrinol.* 201, 351–359. doi: 10.1677/JOE-08-0312
- Arce, J. C., De Souza, M. J., Pescatello, L. S., and Luciano, A. A. (1993). Subclinical alterations in hormone and semen profile in athletes. *Fertil. Steril.* 59, 398–404. doi: 10.1016/S0015-0282(16)55684-2
- Armitage, J. A., Khan, I. Y., Taylor, P. D., Nathanielsz, P. W., and Poston, L. (2004). Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: how strong is the evidence from experimental models in mammals? *J. Physiol.* 561(Pt 2), 355–377. doi: 10.1113/jphysiol.2004.072009
- Bakos, H. W., Henshaw, R. C., Mitchell, M., and Lane, M. (2011). Paternal body mass index is associated with decreased blastocyst development and reduced live birth rates following assisted reproductive technology. *Fertil. Steril.* 95, 1700–1704. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.11.044
- Barella, L. F., de Oliveira, J. C., Branco, R. C., Camargo, R. L., Gomes, R. M., Mendes, F. C., et al. (2012). Early exposure to a high-fat diet has more drastic consequences on metabolism compared with exposure during adulthood in rats. *Horm. Metab. Res.* 44, 458–464. doi: 10.1055/s-0032-1306300
- Brooks, G. A., and White, T. P. (1978). Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exerc. Physiol.* 45, 1009–1015.
- Cano, P., Jimenez-Ortega, V., Larrad, A., Reyes Toso, C. F., Cardinali, D. P., and Esquifino, A. I. (2008). Effect of a high-fat diet on 24-h pattern of circulating levels of prolactin, luteinizing hormone, testosterone, corticosterone, thyroid-stimulating hormone and glucose, and pineal melatonin content, in rats. *Endocrine* 33, 118–125. doi: 10.1007/s12020-008-9066-x
- Chen, X. L., Gong, L. Z., and Xu, J. X. (2013). Antioxidative activity and protective effect of probiotics against high-fat diet-induced sperm damage in rats. *Animal* 7, 287–292. doi: 10.1017/S1751731112001528
- Chigurupati, S., Son, T. G., Hyun, D. H., Lathia, J. D., Mughal, M. R., Savell, J., et al. (2008). Lifelong running reduces oxidative stress and degenerative changes in the testes of mice. *J. Endocrinol.* 199, 333–341. doi: 10.1677/JOE-08-0306
- de Oliveira, J. C., Lisboa, P. C., de Moura, E. G., Barella, L. F., Miranda, R. A., Malta, A., et al. (2013). Poor pubertal protein nutrition disturbs glucose-induced insulin secretion process in pancreatic islets and programs rats in adulthood to increase fat accumulation. *J. Endocrinol.* 216, 195–206. doi: 10.1530/JOE-12-0408
- de Oliveira, J. C., Scomparin, D. X., Andreazzi, A. E., Branco, R. C., Martins, A. G., Gravena, C., et al. (2011). Metabolic imprinting by maternal protein malnourishment impairs vagal activity in adult rats. *J. Neuroendocrinol.* 23, 148–157. doi: 10.1111/j.1365-2826.2010.02095.x
- Du Pressis, S., Kashou, A., Vaamonde, D., and Agarwal, A. (2011). Is there a link between exercise and male factor infertility? *Open Reprod. Sci. J.* 3, 105–113. doi: 10.2174/1874255601103010105
- Ebling, F. J. (2005). The neuroendocrine timing of puberty. *Reproduction* 129, 675–683. doi: 10.1530/rep.1.00367
- Erdemir, F., Atılgan, D. M. F., Boztepe, O., Siha-ırlaktas, B., and Sahin, S. (2012). Efecto de la obesidad inducida por dieta en el tejido testicular y paámetros de estrés oxidativo en el suero. *Actas Urológicas Españolas* 36, 153–159. doi: 10.1016/j.acuro.2011.06.019
- Favareto, A. P., de Toledo, F. C., and Kempinas Wde, G. (2011). Paternal treatment with cisplatin impairs reproduction of adult male offspring in rats. *Reprod. Toxicol.* 32, 425–433. doi: 10.1016/j.reprotox.2011.10.003
- Fernandes, G. S., Arena, A. C., Fernandez, C. D., Mercadante, A., Barbisan, L. F., and Kempinas, W. G. (2007). Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reprod. Toxicol.* 23, 106–112. doi: 10.1016/j.reprotox.2006.09.002
- Fernandez, C. D., Bellentani, F. F., Fernandes, G. S., Perobelli, J. E., Favareto, A. P., Nascimento, A. F., et al. (2011). Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 9:32. doi: 10.1186/1477-7827-9-32
- Ferreira, J. C., Rolim, N. P., Bartholomeu, J. B., Gobatto, C. A., Kokubun, E., and Brum, P. C. (2007). Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 34, 760–765. doi: 10.1111/j.1440-1681.2007.04635.x
- Gaesser, G. A., Angadi, S. S., and Sawyer, B. J. (2011). Exercise and diet, independent of weight loss, improve cardiometabolic risk profile in overweight and obese individuals. *Phys. Sportsmed.* 39, 87–97. doi: 10.3810/psm.2011.05.1898
- Gomes, R. M., Saavedra, L., Francisco, F. A., Ferreira Junior, M. D., Sintra, J. D., Previante, C., et al. (2016). "High-fat diet intake during puberty induces obesity and liver steatosis in male rats at adulthood," in *Endocrinologia and Diabetes Clinica e Experimental*, Vol. XVI, 1938 (Curitiba).
- Gomes, R. M., Tofolo, L. P., Rinaldi, W., Scomparin, D. X., Grassioli, S., Barella, L. F., et al. (2013). Moderate exercise restores pancreatic Beta-cell function and autonomic nervous system activity in obese rats induced by high-fat diet. *Cell. Physiol. Biochem.* 32, 310–321. doi: 10.1159/000354439
- Henriksen, E. J. (2002). Invited review: effects of acute exercise and exercise training on insulin resistance. *J. Appl. Physiol.* 93, 788–796. doi: 10.1152/jappphysiol.01219.2001
- Johnson, L. H., I. N., Curley, K. O., Graham, J., Welsh, T. H., and Staub, C. (2015). "Toxicology of reproductive and endocrine system," in *Reference Module in Biomedical Sciences, 2nd Edn*, ed M. Caplan (Elsevier), 5–59.
- Kriegel, T. M., Heidenreich, F., Kettner, K., Pursche, T., Hofflack, B., Grunewald, S., et al. (2009). Identification of diabetes- and obesity-associated proteomic changes in human spermatozoa by difference gel electrophoresis. *Reprod. Biomed. Online* 19, 660–670. doi: 10.1016/j.rbmo.2009.07.001
- Leblond, C. P., and Clermont, Y. (1952). Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfurous acid technique. *Am. J. Anat.* 90, 167–215. doi: 10.1002/aja.1000900202
- Levin, B. E. (2005). Factors promoting and ameliorating the development of obesity. *Physiol. Behav.* 86, 633–639. doi: 10.1016/j.physbeh.2005.08.054
- Liu, Y., Zhao, W., Gu, G., Lu, L., Feng, J., Guo, Q., et al. (2014). Palmitoyl-protein thioesterase 1 (PPT1): an obesity-induced rat testicular marker of reduced fertility. *Mol. Reprod. Dev.* 81, 55–65. doi: 10.1002/mrd.22281
- Malta, A., de Moura, E. G., Ribeiro, T. A., Tofolo, L. P., Abdennebi-Najar, L., Vieau, D., et al. (2015). Protein-energy malnutrition at mid-adulthood does not imprint long-term metabolic consequences in male rats. *Eur. J. Nutr.* 55, 1423–1433. doi: 10.1007/s00394-0015-00960-00398
- Manna, I., Jana, K., and Samanta, P. K. (2004). Intensive swimming exercise-induced oxidative stress and reproductive dysfunction in male wistar rats: protective role of alpha-tocopherol succinate. *Can. J. Appl. Physiol.* 29, 172–185. doi: 10.1139/h04-013
- McMillen, I. C., and Robinson, J. S. (2005). Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol. Rev.* 85, 571–633. doi: 10.1152/physrev.00053.2003
- McPherson, N. O., Fullston, T., Aitken, R. J., and Lane, M. (2014). Paternal obesity, interventions, and mechanistic pathways to impaired health in offspring. *Ann. Nutr. Metab.* 64, 231–238. doi: 10.1159/000365026
- McPherson, N. O., and Lane, M. (2015). Male obesity and subfertility, is it really about increased adiposity? *Asian J. Androl.* 17, 450–458. doi: 10.4103/1008-682X.148076
- Metges, C. C. (2009). Early nutrition and later obesity: animal models provide insights into mechanisms. *Adv. Exp. Med. Biol.* 646, 105–112. doi: 10.1007/978-1-4020-9173-5_11
- Moreno, L. A., Rodriguez, G., Fleta, J., Bueno-Lozano, M., Lazaro, A., and Bueno, G. (2010). Trends of dietary habits in adolescents. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 50, 106–112. doi: 10.1080/10408390903467480
- Mortazavi, M., Salehi, L., Alizadeh, Z., Vahabian, M., and Roushdeh, A. M. (2014). Protective effects of antioxidants on sperm parameters and seminiferous tubules epithelium in high fat-fed rats. *J. Reprod. Infertil.* 15, 22–28.
- Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., Graetz, N., Margono, C., et al. (2014). Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 384, 766–781. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60460-8
- Palmer, N. O., Bakos, H. W., Owens, J. A., Setchell, B. P., and Lane, M. (2012). Diet and exercise in an obese mouse fed a high-fat diet improve metabolic health and reverse perturbed sperm function. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 302, E768–E780. doi: 10.1152/ajpendo.00401.2011

- Paula Franco Punhagui, A., Rodrigues Vieira, H., Eloisa Munhoz De Lion Siervo, G., da Rosa, R., and Scantamburlo Alves Fernandes, G. (2016). Ethanol exposure during peripubertal period increases the mast cell number and impairs meiotic and spermiatic parameters in adult male rats. *Microsc. Res. Tech.* 79, 541–549. doi: 10.1002/jemt.22664
- Radahmadi, M., Alaei, H., Sharifi, M. R., and Hosseini, N. (2013). The effect of synchronized forced running with chronic stress on short, mid and long-term memory in rats. *Asian J. Sports Med.* 4, 54–62.
- Robb, G. W., Amann, R. P., and Killian, G. J. (1978). Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J. Reprod. Fertil.* 54, 103–107. doi: 10.1530/jrf.0.0540103
- Rodriguez-Gonzalez, G. L., Reyes-Castro, L. A., Vega, C. C., Boeck, L., Ibanez, C., Nathanielsz, P. W., et al. (2014). Accelerated aging of reproductive capacity in male rat offspring of protein-restricted mothers is associated with increased testicular and sperm oxidative stress. *Age (Dordr.)* 36:9721. doi: 10.1007/s11357-014-9721-5
- Rodriguez-Gonzalez, G. L., Vega, C. C., Boeck, L., Vazquez, M., Bautista, C. J., Reyes-Castro, L. A., et al. (2015). Maternal obesity and overnutrition increase oxidative stress in male rat offspring reproductive system and decrease fertility. *Int. J. Obes.* 39, 549–556. doi: 10.1038/ijo.2014.209
- Salam, R. A., and Bhutta, Z. A. (2015). 2.7 Adolescent nutrition. *World Rev. Nutr. Diet.* 113, 122–126. doi: 10.1159/000367879
- Santos, M., Rodriguez-Gonzalez, G. L., Ibanez, C., Vega, C. C., Nathanielsz, P. W., and Zambrano, E. (2015). Adult exercise effects on oxidative stress and reproductive programming in male offspring of obese rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 308, R219–R225. doi: 10.1152/ajpregu.00398.2014
- Siervo, G. E., Vieira, H. R., Ogo, F. M., Fernandez, C. D., Goncalves, G. D., Mesquita, S. F., et al. (2015). Spermiatic and testicular damages in rats exposed to ethanol: influence of lipid peroxidation but not testosterone. *Toxicology* 330, 1–8. doi: 10.1016/j.tox.2015.01.016
- Soliman, A., De Sanctis, V., and Elalaily, R. (2014). Nutrition and pubertal development. *Indian J. Endocrinol. Metab.* 18(Suppl. 1), S39–S47. doi: 10.4103/2230-8210.145073
- Tofolo, L. P., da Silva Ribeiro, T. A., Malta, A., Miranda, R. A., Gomes, R. M., de Oliveira, J. C., et al. (2015). Short-term moderate exercise provides long-lasting protective effects against metabolic dysfunction in rats fed a high-fat diet. *Eur. J. Nutr.* 54, 1353–1362. doi: 10.1007/s00394-014-0816-7
- Vaamonde, D., Da Silva-Grigoletto, M. E., Garcia-Manso, J. M., Vaamonde-Lemos, R., Swanson, R. J., and Oehninger, S. C. (2009). Response of semen parameters to three training modalities. *Fertil. Steril.* 92, 1941–1946. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.09.010
- Vaamonde, D., Du Pressis, S., and Agarwal, A. (2016). "Impact of physical activity and exercise on male reproductive potential: semen alterations," in *Exercise and Human Reproduction: Induced Fertility Disorders and Possible Therapies*, ed S. Sciences, 101–115.
- Viguera-Villasenor, R. M., Rojas-Castaneda, J. C., Chavez-Saldana, M., Gutierrez-Perez, O., Garcia-Cruz, M. E., Cuevas-Alpuche, O., et al. (2011). Alterations in the spermiatic function generated by obesity in rats. *Acta Histochem.* 113, 214–220. doi: 10.1016/j.acthis.2009.10.004
- Zambrano, E., Guzman, C., Rodriguez-Gonzalez, G. L., Durand-Carbajal, M., and Nathanielsz, P. W. (2014). Fetal programming of sexual development and reproductive function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 382, 538–549. doi: 10.1016/j.mce.2013.09.008
- Zouhal, H., Lemoine-Morel, S., Mathieu, M. E., Casazza, G. A., and Jabbour, G. (2013). Catecholamines and obesity: effects of exercise and training. *Sports Med.* 43, 591–600. doi: 10.1007/s40279-013-0039-8

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Ibáñez, Erthal, Ogo, Peres, Vieira, Conejo, Tófolo, Francisco, da Silva Silveira, Malta, Pavanello, Martins, da Silva, Jacinto Saavedra, Gonçalves, Moreira, Alves, da Silva Franco, Previante, Gomes, de Oliveira Venci, Dias, Armitage, Zambrano, Mathias, Fernandes and Palma-Rigo. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

2. OTRAS PUBLICACIONES DESARROLLADAS DURANTE EL DOCTORADO

Maternal Obesity: Lifelong Metabolic Outcomes for Offspring from Poor Developmental Trajectories During the Perinatal Period..... 117

Accelerated aging of reproductive capacity in male rat offspring of protein-restricted mothers is associated with increased testicular and sperm oxidative stress (Resumen)..... 129

Adult exercise effects on oxidative stress and reproductive programming in male offspring of obese rats (Resumen) 130

Macrophage Populations in Visceral Adipose Tissue from Pregnant Women: Potential Role of Obesity in Maternal Inflammation (Resumen) 131

Maternal obesity has sex-dependent effects on insulin, glucose and lipid metabolism and the liver transcriptome in young adult rat offspring (Resumen) 133

El perfil de expresión de genes adipogénicos en ratas macho descendientes de madres obesas está relacionado a la patogénesis de la resistencia a la insulina (Cartel) 135



REVIEW ARTICLE

Maternal Obesity: Lifelong Metabolic Outcomes for Offspring from Poor Developmental Trajectories During the Perinatal Period

Elena Zambrano, Carlos Ibáñez, Paola M. Martínez-Samayoá, Consuelo Lomas-Soria, Marta Durand-Carbajal, and Guadalupe L. Rodríguez-González

Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México, D.F., México

Received for publication March 13, 2015; accepted January 19, 2016 (ARCMED-D-15-00169).

The prevalence of obesity in women of reproductive age is increasing in developed and developing countries around the world. Human and animal studies indicate that maternal obesity adversely impacts both maternal health and offspring phenotype, predisposing them to chronic diseases later in life including obesity, dyslipidemia, type 2 diabetes mellitus, and hypertension. Several mechanisms act together to produce these adverse health effects including programming of hypothalamic appetite-regulating centers, increasing maternal, fetal and offspring glucocorticoid production, changes in maternal metabolism and increasing maternal oxidative stress. Effective interventions during human pregnancy are needed to prevent both maternal and offspring metabolic dysfunction due to maternal obesity. This review addresses the relationship between maternal obesity and its negative impact on offspring development and presents some maternal intervention studies that propose strategies to prevent adverse offspring metabolic outcomes. © 2016 IMSS. Published by Elsevier Inc.

Key Words: Developmental programming, Dietary intervention, Fetal programming, Maternal obesity, Metabolic syndrome, Offspring phenotype.

Introduction

Obesity rates have increased exponentially worldwide to almost epidemic proportions (1–3). The World Health Organization (WHO) has declared obesity as one of the top ten adverse health risk conditions in the world. Worldwide, 1.5 billion people are either overweight with a body mass index (BMI) > 25 kg/m² or obese (BMI > 30 kg/m²) (3). The recent rise in obesity rates is associated with the interaction between genes, physical activity and changes in dietary habits (4) including augmented consumption of foods that are either industrial processed or dense in energy (5).

Obesity and overweight are prevalent in women of reproductive age (6–12). In Mexico the predominance is 32.4% (6,8), in the United States 35.5% (10), in Brazil 16.1% (9), in the United Kingdom 33% (11), in Ghana 37.1% (7) and in China 16% (12). Maternal obesity can

result in negative metabolic disorders for both the mother (13,14) and the offspring (Figure 1) (13,15–17). The link between maternal obesity and adverse offspring health consequences are complex and likely involves alterations in glucose and lipid metabolism as well as altered leptin levels in obese women (18–20). This review will focus on metabolic aspects of maternal obesity and the effect on their offspring and how modifications of maternal lifestyle can improve maternal and fetal outcomes.

Glucose and Lipid Metabolism During Pregnancy

During pregnancy the mother adapts her metabolism to support fetal growth and development (20–22). Such adaptations are divided in two metabolic stages. Stage one includes the first two thirds of pregnancy where a predominantly anabolic condition is observed in which insulin secretion allows maternal body fat accumulation (20–23) as seen in pregnant women (24) and rats (25,26). During late gestation (second stage), the catabolic metabolism (20–22,27) is characterized by an insulin resistance state to direct maternal energy to the fetus (21,28,29). Therefore,

Address reprint requests to: Elena Zambrano, Vasco de Quiroga 15, Belisario Domínguez, Sección XVI, México City, D.F., 14080 México; Phone: (+52) (55) 5487-0900; E-mail: zamgon@unam.mx

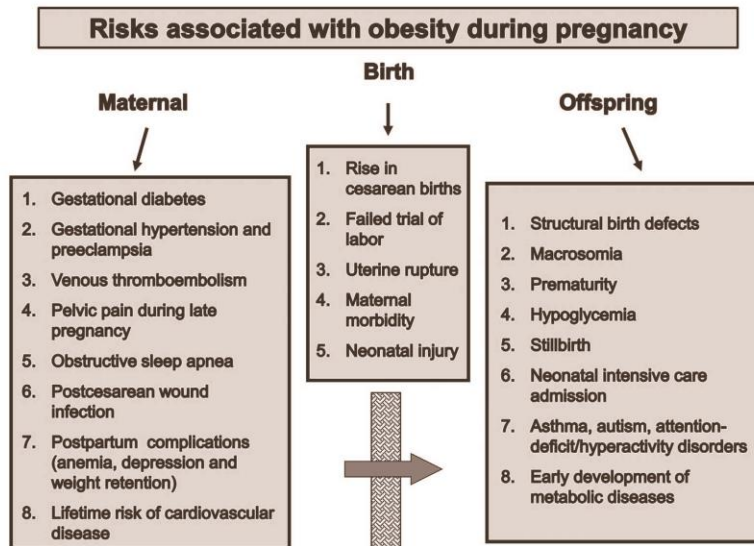


Figure 1. Maternal and offspring risks associated with obesity during pregnancy.

maternal energy reserves stored during the first trimester of pregnancy play an important role in the maternal metabolic adaptations that permit her to fulfill fetal demands in late pregnancy (21,22,30).

Glucose is the most important fetal energy substrate (21,22,28). The fetus uses >50% of the total maternal glucose turnover (31,32). Maternal hypoglycemia observed during late pregnancy is the consequence of improved glucose utilization by the placenta and fetus. The constant glucose supply depends on increased maternal hepatic gluconeogenesis (21,33) which, in late gestation, depends on the type of the substrate; for example, glycerol is metabolized faster than alanine (34, 35).

Regarding maternal lipid metabolism, body fat accumulation during the first part of gestation is due to hyperphagia (21), increased lipogenesis (27,36) and decreased hepatic lipoprotein lipase (LPL) activity (37). During late pregnancy, there is a reduced uptake of circulating triglycerides (38) and increased adipose tissue lipolysis. Glycerol and free fatty acids are released into the circulation and captured by the liver (Figure 2A) (21,36,39). They are then converted into their active forms, acyl-CoA and glycerol-3-phosphate, respectively, so they can be re-esterified and synthesized into triglycerides released into circulation (21,22,38,39), increasing maternal plasmatic very-low-density lipoproteins (VLDL) at the highest concentrations (40). In addition to increased lipolysis and decreased LPL activity, the increase in estrogens concentration (39) and insulin resistance

state (41) may also contribute to the increased VLDL-triglyceride levels during pregnancy (Figure 2A). Under fasting conditions glycerol is used for glucose synthesis and free fatty acids are metabolized in the liver by β -oxidation of acetyl-CoA and ketone bodies (21,35). Ketone bodies are important alternative energy substrates for the fetal brain because lipids are not readily transported across the placenta (21,36,39).

Long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs) are important to the fetus. However, due to the limited capacity of the fetus to modify the structure of essential LC-PUFAs, their long-chain derivatives have to be transferred from the mother to the fetus through the lipoprotein receptors and fatty acid binding proteins in the placenta in appropriate amounts to enable normal fetal development, especially of the eyes and nervous system (42).

Effect of Maternal Obesity on Fuel Metabolism During Pregnancy

Obese women have higher energy supplies and metabolic rates during pregnancy than non-obese women (43). The physiological insulin resistance observed in late normal pregnancy is magnified in pregnant women with obesity and diabetes (20,44). These condition expose the fetus to exaggerated levels of metabolic fuels such as glucose and lipids (Figure 2B) (20,45–47). A recent study shows that high glucose levels diminish placental mitochondrial

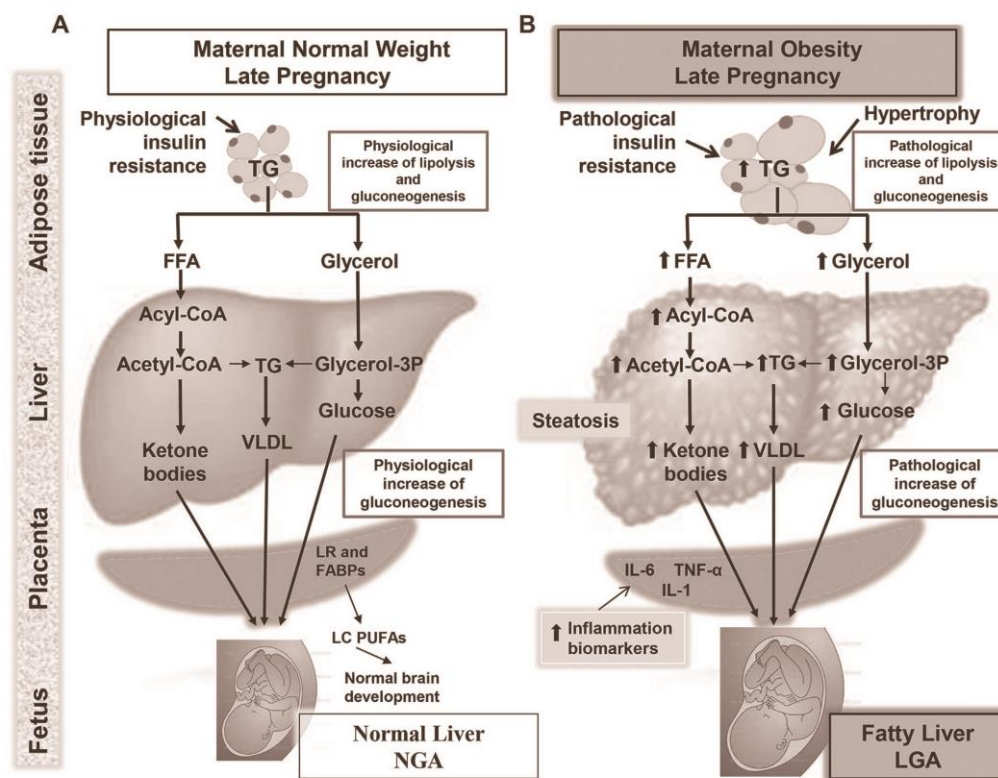


Figure 2. Glucose and lipid metabolism during late pregnancy in maternal normal weight (A) and maternal obesity (B). Figure B illustrates the pathological increase of diverse hormonal, metabolic and inflammatory biomarkers at different sites (adipose tissue, liver, placenta and the fetus) during late pregnancy. TG, triglycerides; FFA, free fatty acids; VLDL, very-low-density lipoproteins; LR, lipoprotein receptor; FABPs, fatty acid binding proteins; LC-PUFAs, long-chain polyunsaturated fatty acids; IL-6, interleukin-6; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; IL-1, interleukin-1; C-RP, C-reactive protein; NGA, normal for gestational age; LGA, large for gestational age.

fatty acid oxidation through inhibition of CPT-I, thus increasing triglyceride accumulation in the human placenta (48).

Normal and obese pregnant women tend to gain similar fat mass (47); however, the distribution of stored fat is different (49). Lean women tend to store fat in the lower body compartments and obese women in central compartments (20,47,49). Central adiposity is associated with fat accumulation in the liver and placenta (47,49); therefore, obese women have a predisposition to develop lipotoxicity and metabolic dysfunction that may be increased by the accumulation of further fat deposits during pregnancy (49). As a consequence of adipose tissue dysfunction and altered hepatic metabolism there is a pathological increase of several maternal serum parameters such as hormonal (progesterone and cortisol), metabolic (glucose, lipids, adiponectin and

leptin) and inflammatory cytokines (IL-6: interleukin-6, C-RP: C-reactive protein, TNF- α : tumor necrosis factor- α) (50,51). In obese pregnant women, VLDL-triglycerides plasma levels are elevated due to the increase of fat lipolysis that leads to hyperlipidemia (51). The increased levels of free fatty acids from VLDL-triglycerides are up taken by the placenta, which turns itself into a storage site for lipids for its subsequent hydrolysis and release into fetal plasma (39). Fetal exposure to excess blood lipids affects both the placenta and adipose tissue through the activation of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 (interleukin-1), IL-6, C-RP and TNF- α (Figure 2B) (52), affecting organ development and the response to the postnatal environment (50,51). Therefore, excessive fetal exposure to fuel sources increases fetal size, fat storage, and increased risks of postnatal disease (Figures 2B and 3) (49,53,54).

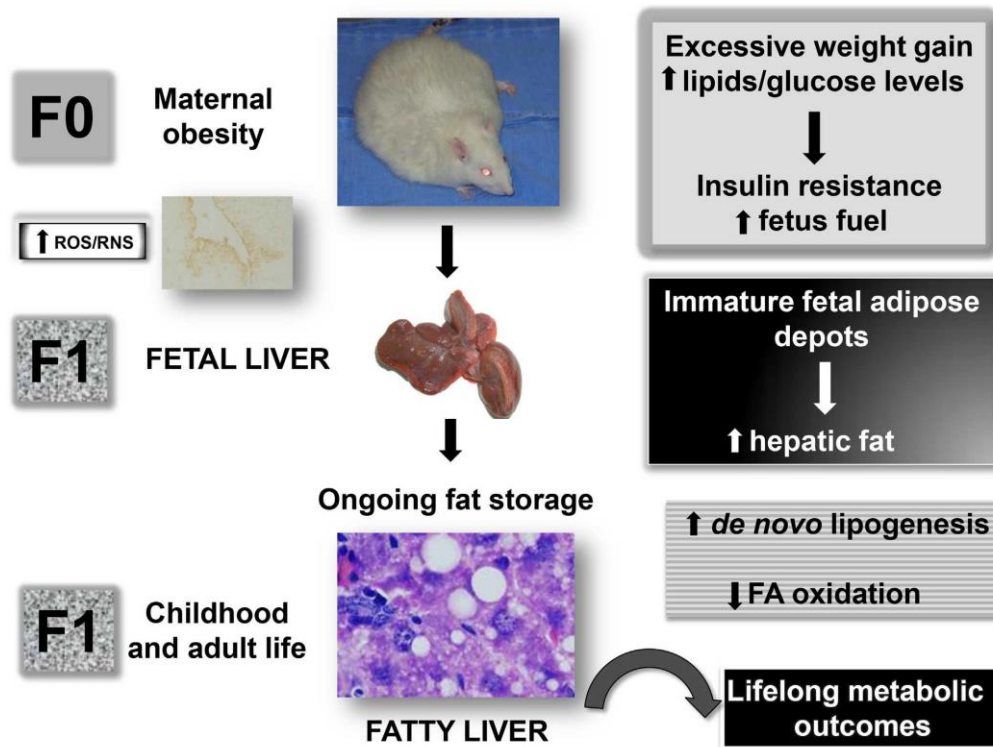


Figure 3. Excessive transplacental lipid delivery from obese mother exposes the fetal liver to fat storage due to its immature adipose depots incapable to counter triglyceride accumulation, increasing the risk of hepatic steatosis predisposing offspring to lifelong metabolic outcomes. F0: mothers, F1: first-generation, FA, fatty acids, ROS/RNS, reactive oxygen species/reactive nitrogen species. (A color figure can be found in the online version of this article.)

Developmental Origins of Health and Disease “DOHaD” Hypothesis

Programming by adverse conditions during development is also well accepted as a major determinant of offspring health. The developmental origins of health and disease (DOHaD) hypothesis, also called “developmental programming,” can be defined as the response to a specific challenge to the mammalian organism during a critical developmental time window that alters the trajectory of development with resulting effects on health that persist throughout life (55). Exposure to an unfavorable environment during pregnancy and lactation programs changes in fetal or neonatal physiology and metabolism, increasing risks of developing diseases or altered physiologic functions in adult life (56) such as hypertension, dyslipidemias, cardiovascular diseases, reproductive function (57,58), learning and motivation behavior (59), among others. Epidemiological and animal studies have extensively investigated the developmental effects of

suboptimal maternal nutrition such as the programming of obesity (60). One of the most interesting and significant features of developmental programming is the evidence that adverse consequences of altered intrauterine environments can be passed from first-generation (F1) to second-generation (F2) offspring (61). Programming effects may be transmissible across generations through both maternal and paternal inheritance by mechanisms that do not necessarily involve structural gene changes and often have different effects in males and females. However, the mechanisms remain unclear (61–64). There are studies that demonstrate that DNA epigenetic modifications can be inherited transgenerationally, even if these subsequent generations are not directly exposed to the negative programming environment, e.g., maternal obesity, but are still affected (65–67). Programming of obesity could occur by permanent alteration of one or more relevant metabolic pathways during early development (60).

Epidemiological Studies

Epidemiological studies have shown that children of obese mothers are at highest risk of becoming obese early in life (68,69). In a retrospective cohort study, children from obese mothers were evaluated. It was shown that at the age of 2, 3 and 4 years, the prevalence of childhood obesity was 9.5, 12.5 and 14.8%, respectively. Another interesting finding was that by 4 years of age, 24.1% of children were obese if their mothers were obese compared with 9.0% of children whose mothers had normal weight (69). Yu et al. and Lau et al. (70,71), in two recent systematic reviews, confirmed that pre-pregnancy overweight or obesity increases the risk for large for gestational age babies with higher birth weights associated with other subsequent offspring health problems such as overweight and obesity when compared with mothers of normal weight. The authors conclude that many other factors such as maternal age, ethnicity, gestational hypertension, gestational diabetes mellitus, smoking during pregnancy, educational level, and gestational weight gain affect the association between pre-pregnancy weight and birth weight. In a prospective birth cohort study, "The Copenhagen Perinatal Cohort" established in 1959–1961, 4234 subjects with follow-up examinations from 1–42 years of age (72) demonstrated a strong association between gestational weight gain and adult BMI. These observations have been confirmed in several cohorts in other countries (73,74). Young adults from obese mothers have higher glucose levels, greater insulin resistance and higher lipid levels than those from normal weight mothers (68,75).

BMI and glucose tolerance (76,77) are important factors that increase the risk of large for gestational age babies. Recent data showed that high maternal BMI, independent of maternal glycaemia, is associated with increased birth weight and cord blood C-peptide serum levels (78). Fetuses from obese mothers (pre-pregnancy BMI 38.4 kg/m²) are more insulin resistant than fetuses from lean mothers (pre-pregnancy BMI 22.0 kg/m²), showing that there is a positive correlation between maternal BMI and fetal insulin resistance (79).

Maternal weight gain itself also plays an important role. Women exceeding the Institute of Medicine Recommendations (IOM) for gestational weight gain (Table 1) (80) are more

likely to have children with greater adiposity and its associated metabolic traits (76,81). Some women retain weight after each pregnancy (80).

In a meta-analysis, Mannan et al. (82) explored the association between weight gain during pregnancy and postpartum weight retention and obesity independent of postpartum time span. This study included data on weight-change trajectory from 6 months to 21 years postpartum showing a U-shaped trend in weight gain suggesting the involvement of other factors like lifestyle changes over the years. Maternal weight gain and increased BMI between pregnancies increases the risk of overweight in offspring compared with their siblings (76).

The increasing prevalence of obesity in pregnant women has led to the suggestion that maternal hyperlipidemia and hyperglycemia also have contributed to the population's increase in mean birth weight (83), childhood and adult obesity and related metabolic disorders (84). Maternal high plasma triglycerides and glucose levels in obese mothers may be responsible for excessive fetal growth (85,86) and development of metabolic disorders in offspring. Although some studies have demonstrated a positive association between maternal glucose concentration and birth weight, other studies demonstrated that even if glucose levels in obese mothers are unchanged compared with non-obese mothers, offspring can still be metabolically affected. For example, obese mothers with normal blood glucose can give birth to babies with normal weight and increased adiposity (87) and who later in life develop obesity and insulin resistance (75).

However, an adequately powered, high-quality cohort study is needed to validate the impact of pre-pregnancy maternal obesity on infant birth weight and offspring overweight and/or obesity.

Animal Studies

Several studies conducted in different animal species including nonhuman primates (88,89), sheep (78,90) and rodents (63,91) have shown that maternal high-fat diet consumption leads to metabolic abnormalities in offspring in adult life (88,91–94) such as increased body weight and fat mass, reduced insulin sensitivity (75,92), increased blood glucose and triglyceride levels (85,91), increased

Table 1. Recommendations for total and rate of weight gain during pregnancy according to prepregnancy BMI

Pregpregnancy	BMI (kg/m ²) (WHO)	Total weight gain range		Rates of weight gain 2nd and 3rd trimester mean (range) ^a	
		lb	kg	lb/week	kg/week
Underweight	<18.5	28–40	12.5–18	1 (1–1.3)	0.51 (0.44–0.58)
Normal weight	18.5–24.9	25–35	11.5–16	1 (0.8–1)	0.42 (0.35–0.50)
Overweight	25.0–29.9	15–25	7–11.5	0.6 (0.5–0.7)	0.28 (0.23–0.33)
Obese (includes all classes)	≥30.0	11–20	5–9	0.5 (0.4–0.6)	0.22 (0.17–0.27)

^aCalculations assume a 0.5–2 kg (1.1–4.4 lb) weight gain in the first trimester.

Adapted from Weight Gain During Pregnancy: Reexamining The Guidelines (Institute of Medicine of National Academies, 2009).

lipid deposition and defects in fatty acid metabolism (88,95,96) as well as increased leptin levels and hypothalamic alterations (97) of appetite-regulating neuropeptide (98,99). It has also been observed that maternal obesity in nonhuman primate (88), sheep (78,100) and rats (95,96) alters liver metabolism in offspring (Figure 3).

In a study performed in nonhuman primates, it was demonstrated that offspring of obese mothers were heavier, with increased fat mass, higher leptin as well as increased hepatic levels of oxidative stress, triglycerides and expression of gluconeogenic enzymes (88). In the offspring, maternal obesity also increased the expression of several markers related to vascular inflammation and fibrinolytic and endothelial function (89).

In a study conducted in sheep, it was observed that lambs born from obese mothers have an increased adiposity and by 19 months of age exhibit hyperphagia, glucose and insulin dysregulation, and increased adiposity index compared to control offspring (101). It was also observed that overfeeding ewes prior to and throughout gestation increases expression of fetal cardiac proinflammatory mediators in the fetal heart and alters fetal cardiac morphology and function (102,103).

In the rat, using a model of maternal “junk food” diet rich in fat and sugar during pregnancy and lactation, it was observed that male offspring showed hepatic steatosis and altered hepatic expression of genes associated with insulin sensitivity, increased lipogenesis and lipid oxidation, whereas in females the gene expression profile was indicative of hepatic insulin resistance (95). Likewise, it has been shown that a maternal cafeteria diet during pregnancy and lactation causes liver steatosis in adult offspring (Figure 3). Male offspring of obese rats showed a significant increase in serum glucose, insulin, leptin, VLDL, apolipoprotein B100 and lipid levels as well as a permanent reduction in hepatic β -oxidation and an increase in hepatic lipogenesis (96).

Offspring of obese rats are programmed for pancreatic dysfunction, leading to glucose intolerance and increased plasma insulin in adulthood. It has been shown that maternal hyperinsulinemia predisposes male offspring islets to have greater insulin secretion (104).

In our group we have shown in rats that maternal high-fat diet consumption prior and throughout pregnancy and lactation increased fat in the milk (105) and in the male offspring (even if they were fed with control diet after weaning), fat cell size and mass, serum triglycerides, leptin and insulin concentrations, leading to developmental programming of offspring who are predisposed to obesity, diabetes, appetite disorders and other chronic diseases (91).

Other investigators have shown that hypothalamic systems that regulate appetite and energy balance may be permanently modified during early development by exposure to maternal adiposity and a high-fat diet (99). Maternal obesity induced by a high-fat diet prior to and

during pregnancy in rats alters leptin and insulin signaling and expression of orexigenic and anorexigenic peptides in term fetal hypothalamus (97). These findings observed in the late fetal period would tend to predispose to hyperphagia and obesity in postnatal life. In a model of maternal nutritional excess in mice, offspring are hyperphagic with reduced locomotor activity associated with an increased abdominal adiposity compared with offspring of controls. In addition, fasting insulin was increased at 3 months and fasting plasma glucose by 6 months (92). Maternal obesity in the rat negatively programs male offspring exploratory, learning and motivation behavior in adulthood (59).

Mechanisms

The mechanisms whereby maternal obesity affects fetal and postnatal development remain poorly understood. However, animal models have replicated human epidemiologic findings to elucidate potential programming mechanisms that include altered organ development, cellular signaling responses and epigenetic modifications (106).

Alterations in maternal physiology may explain some of the effects. For example, it is known that steroid hormones regulate fetal organ development and maturation and are used as treatment during pregnancy to accelerate lung maturation in pregnancies undergoing premature labor. Fetal exposure to levels of glucocorticoids that are inappropriately high for the current stage of development reduces birth weight (107) and is associated with long-term dysfunctional outcomes such as hypertension (108) and impaired glucose tolerance in the adult offspring (109). Maternal obesity elevates maternal corticosterone in the rat (94) as well as in offspring (55,59,110,111). Maternal and fetal cortisol levels are increased in obese ewes (90).

Programming of hypothalamic appetite-regulating centers by maternal obesity is another potential mechanism involved in the adverse metabolic effects in offspring. Neurons that regulate the balance of energy intake and output to maintain normal body weight and composition are located at the hypothalamic arcuate nuclei (ARH). Leptin regulates feeding behavior by acting on the ARH to reduce hunger and increase energy expenditure (112,113). In the rat, maternal obesity induced by a high-fat diet prior to and during pregnancy alters leptin signaling and expression of orexigenic and anorexigenic peptides in term fetal hypothalamus (97). Hyperinsulinemia and leptinemia observed in late gestation in obese pregnant rats is associated with higher serum leptin of their fetuses. Elevated levels of mRNA of leptin and neuropeptide Y are present in the fetal hypothalamus in progeny of obese mothers indicating that fetal orexigenic neuropeptides are already upregulated by term (97,98). Some experiments indicate that maturation of the appetite centers

begins in fetal life in the sheep (114) and in non-human primates (113). Whereas several studies show that the appetite control system develops postnatally, in the rat there is a leptin peak at ~10–14 days of postnatal life. Rat pups from obese mothers have a delay in the leptin peak with higher amplitude (99). The newborn lamb also has a leptin peak during the first week of life, but maternal obesity in the ewe decreases the newborn lamb leptin peak (115). Evidence suggests that maternal obesity provides an early life altered intrauterine environment that programs an increased orexigenic relative to anorexigenic drive in the hypothalamic appetite centers. As a result, when food availability is unlimited in later life these programmed offspring eat more and become fat (94).

Increasing maternal oxidative stress is another potential programming mechanism to increase the risk of offspring adult disease. In the rat, maternal obesity increases both maternal and offspring oxidative/nitrative stress markers (94). Maternal obesity produced by high-fat diets in mice alters mitochondrial integrity and increases reactive oxygen species (ROS) generation in the offspring (104) potentially due to overstimulation of electron transport chain and oxidative phosphorylation (76). It has also been shown that fetuses from obese mothers present vessel wall damage and disruption of normal growth as a consequence of increased oxidative stress (19,116).

One area of epigenetics that has received little attention is the potential alteration of the methionine cycle by high-calorie diets and obesity that affects methylation of DNA resulting in epigenetic changes (94). It has been shown that in the baboon maternal obesity increased levels of maternal and fetal homocysteine (117).

Intervention Studies on Human and Animal Models

Due to the link between obesity and metabolic syndrome, strategies are of prime importance in halting the cyclical recurrence of metabolic syndrome from mother to daughter to granddaughter (118). There is much interest in the development of clinical trials to discover effective interventions and to improve maternal health in obese pregnancy and to prevent offspring outcomes.

Interventional strategies to reduce the weight of obese women via bariatric surgery reduce the risk of obesity and other adverse effects in subsequent offspring compared to those born before maternal surgery (119). However, bariatric surgery is expensive and may have potential surgical complications. Ideally, obese women should lose weight before conception, but realistically this goal is quite difficult to achieve (83). Currently, both maternal diet and exercise are under evaluation as potentially modifiable factors (110).

In a study performed in Ireland, women were randomized to receive either a low glycemic index (GI) diet or no dietary intervention from early pregnancy to term.

Neonates whose mothers had a low GI diet during pregnancy had lower thigh circumference vs, those of mothers who ate a control diet (120). Also, a low GI diet during pregnancy has been shown to improve maternal glycemia and reduce infant birth weight, an outcome that may be associated with a higher fiber intake (121). A very interesting systematic review revealed success with dietary and lifestyle interventions in pregnant women on weight-related and obstetric outcomes, but no effect was demonstrated on fetal and neonatal morbidity and mortality and no differences in rates of admission to the neonatal intensive care units (122).

In addition to a healthy diet, supplements during pregnancy are recommended. For example, it is known that maternal vitamin D sufficiency is necessary in pregnancy to ensure normal development of the fetal brain (123). However, there is a greater risk of vitamin D deficiency in obese pregnant women and their children compared to pregnant women with normal BMI (124,125).

The effect of LC-PUFAs supplementation has also been evaluated during pregnancy, specifically omega-3. Omega-3 fatty acids derived from fish oils have been shown to exhibit anti-inflammatory effects (126). Omega-3 LC-PUFAs supplementation in pregnancy or lactation has beneficial impact on children's body composition (127). However, omega-3 fatty acids supplementation is controversial because major deficiencies exist in the design and in the reports that support the use of omega-3.

Exercise has benefits on reducing insulin resistance in non-pregnant woman. Studies suggests that women who are more active before pregnancy have lower rates of gestational diabetes and are less insulin-resistant (128). During pregnancy, physical activity is associated with prevention of pre-eclampsia, pre-term delivery and gestational diabetes (129,130), without a negative impact on maternal and offspring outcomes (131). A supervised exercise-based intervention to prevent excessive gestational weight gain resulted to be effective in a trial of normal weight women. However, there were no significant treatment effects in overweight or obese women (132). There are contradictory studies about the effects of physical activity during pregnancy in women who are overweight or obese. However, a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials shows that physical activity interventions were effective for overweight or obese pregnant as well as postpartum women. Pregnant women in the intervention groups gained less weight and lost more body weight postpartum (133).

Animal intervention studies have the value of the ability to control confounding effects much more than human clinical interventions (109). Maternal dietary intervention in ewes fed an obesogenic diet in which the diet was reduced from 150–100% of the control diet beginning on day 28 of gestation was early enough to at least in part prevent some of the negative outcomes in the fetus and offspring. Day 28

of gestation in the sheep is equivalent to the time women confirm they are pregnant (~50 days) providing a gestational potential window of intervention if necessary (110). It has also been published that, in early gestation, diet reduction in obese ewes prevents fetal glucose and insulin dysregulation (118).

We conducted studies on either maternal dietary or exercise intervention prior to and during rat gestation (Figure 4) (91,94). Dietary intervention 1 month before mating and during pregnancy and lactation partially prevents some of the negative biochemical and metabolic parameters observed in offspring from obese mothers (91). We also evaluated the effects of maternal high-fat diet and dietary intervention on male offspring anxiety-related behavior, exploration, learning and motivation. We reported that maternal dietary intervention prevented the increased exploratory behavior displayed by offspring of obese mothers in the open field test and restored normal levels of motivation (59). It is of interest that it was not necessary

to return maternal weight to control levels for benefits to accrue.

Recently we reported the effects of maternal exercise intervention in obese rats before and during pregnancy on mothers and offspring. Exercise did not change maternal weight but did completely prevent the rise in maternal triglycerides and partially the increases in glucose, insulin, cholesterol, leptin, fat and oxidative stress and also recovered the decrease fertility induced by maternal obesity (94). Other authors also demonstrated that maternal exercise before and during pregnancy has beneficial effects on the offspring metabolism and endocrine function (134).

In summary, it is important to promote normalization of body weight in obese women who intend to become pregnant and to provide appropriate advice before and at the beginning of the pregnancy (135). It is clear that maternal interventions before conception will have the best results. Preventions strategies are necessary to integrate guidelines

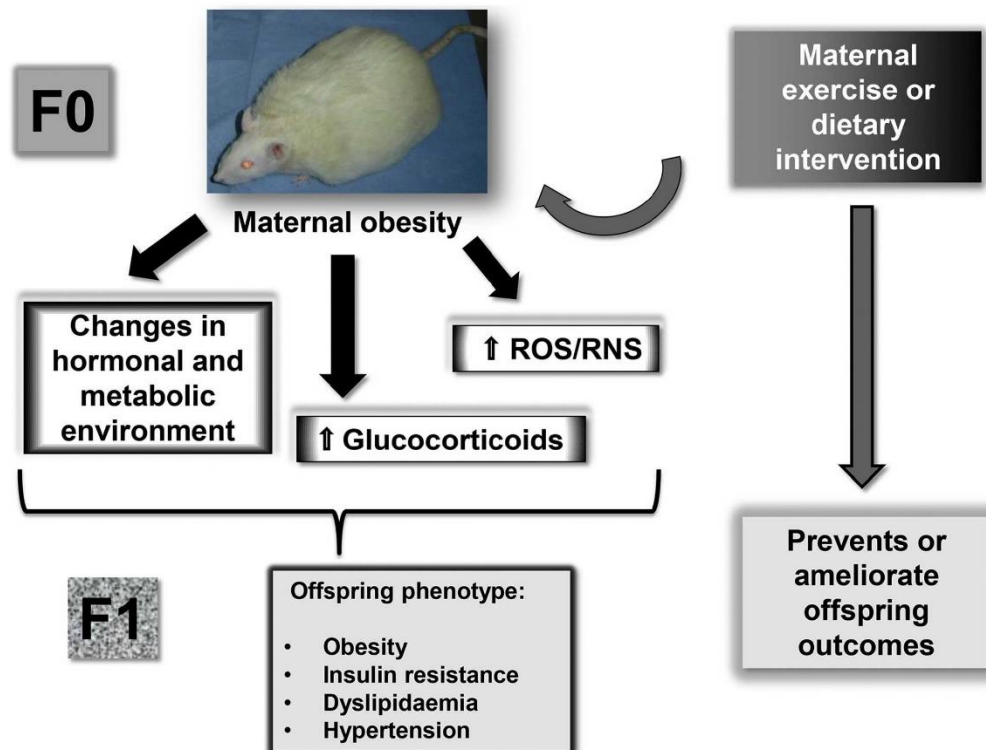


Figure 4. Programming mechanisms. Maternal obese rat picture and intervention effects. F0, mother, F1, first-generation offspring, ROS/RNS, reactive oxygen species/reactive nitrogen species. (A color figure can be found in the online version of this article.)

for optimal pregnancy nutrition and maternal weight gain during gestation and newborn feeding strategies. Given the existence of multiple negative effects of adverse programming on life-course health due to maternal obesity, there is also a need to develop offspring interventions that reverse or ameliorate unwanted outcomes (136).

Guidelines for Public Health: Prevention Is Better than Cure

Maternal pre-pregnancy weight as well as excessive gestational weight gain (GWG) adds the risks of adverse pregnancy outcomes associated with obesity. Unfortunately, current available literature cannot determine how much weight obese pregnant women should gain. The IOM revised the GWG guidelines in 2009. They recommended a weight gain of 5–9 kg for all classes of obesity (Table 1). Human studies have shown that either dietary intervention (137) or exercise during pregnancy (138) appears to be effective in preventing excessive GWG. However, the evidence of the benefits of maternal interventions in both maternal and offspring health is limited. Therefore, translational medicine studies are necessary in this field by implementing more clinical and animal experiments to test the effectiveness of both maternal dietary and physical activity interventions. As Catalano (an expert in this field) says in his review “all treatments must by necessity be empiric. However, we need to build upon the information we currently possess because waiting may not be an option for much longer” (83).

Management of excessive weight before pregnancy and excessive weight gain during pregnancy by a multidisciplinary team is necessary. It is important to offer evidence-based information and advice to obese women during pregnancy by a specialist team with the ability to analyze each pregnancy for specific conditions to avoid distress or anxiety in pregnant women; therefore, the information should be given carefully. For example, the intensity of exercise that an obese pregnant woman needs is unclear. The fact is that preventing excessive GWG in obese pregnant women is of great importance to prevent maternal and offspring outcomes. Therefore, changes in lifestyle such as exercise and diet are useful and inexpensive in the management of obesity, but unfortunately they are likely to fail over the long term. The widespread nature of the problem and the necessity to build intervention programs is clear. Prevention is better than cure.

Conclusion

Based on human clinical and epidemiological as well as experimental animal studies, there is compelling evidence that maternal obesity has negative developmental programming effects on offspring. Further animal studies are necessary to elucidate the mechanisms and indicate potential

interventions. The global increase in obesity among women of reproductive age indicates that a preventive nutritional intervention could influence programming of childhood obesity and its consequences in adult life. Women of reproductive age should be aware of the need to optimize their food intake and body mass index control in order to decrease the likelihood of maternal and progeny complications. Changes in lifestyle and nutritional status during and prior to pregnancy may decrease permanent damage to progeny health; therefore, prevention of obesity should be the goal rather than treatment.

Acknowledgments

This work was supported by CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) Grant #155166.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. James PT. Obesity: the worldwide epidemic. *Clin Dermatol* 2004;22: 276–280.
2. Caballero B. The global epidemic of obesity: An overview. *Epidemiol Rev* 2007;29:1–5.
3. Nguyen T, Lau DC. The obesity epidemic and its impact on hypertension. *Can J Cardiol* 2012;28:326–333.
4. Cordain L, Eaton SB, Sebastian A, et al. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *Am J Clin Nutr* 2005;81:341–354.
5. Anderson JW, Patterson K. Snack foods: comparing nutrition values of excellent choices and “junk foods”. *J Am Coll Nutr* 2005;24: 155–156.
6. Instituto Nacional de Salud Pública. Encuesta Nacional de Salud y nutrición: Resultados Nacionales 2012; 2012. Available at: <http://ensanut.insp.mx/>.
7. Benkeser RM, Biritwum R, Hill AG. Prevalence of overweight and obesity and perception of healthy and desirable body size in urban, Ghanaian women. *Ghana Med J* 2012;46:66–75.
8. Colchero MA, Sosa-Rubí SG. Heterogeneity of income and lifestyle determinants of body weight among adult women in Mexico, 2006. *Soc Sci Med* 2012;75:120–128.
9. Correia LL, da Silveira DM, e Silva AC, et al. Prevalence and determinants of obesity and overweight among reproductive age women living in the semi-arid region of Brazil. *Cien Saude Colet* 2011;16: 133–145.
10. Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, et al. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999–2008. *JAMA* 2010;303:235–241.
11. Heslehurst N, Rankin J, Wilkinson JR, et al. A nationally representative study of maternal obesity in England, UK: trends in incidence and demographic inequalities in 619,323 births, 1989–2007. *Int J Obes (Lond)* 2010;34:420–428.
12. Leung TY, Leung TN, Sahota DS, et al. Trends in maternal obesity and associated risks of adverse pregnancy outcomes in a population of Chinese women. *BJOG* 2008;115:1529–1537.
13. Yu CK, Teoh TG, Robinson S. Obesity in pregnancy. *BJOG* 2006; 113:1117–1125.
14. Kriebs JM. Obesity in pregnancy: addressing risks to improve outcomes. *J Perinat Neonatal Nurs* 2014;28:32–40.
15. Leddy MA, Power ML, Schulkin J. The impact of maternal obesity on maternal and fetal health. *Rev Obstet Gynecol* 2008;1:170–178.
16. Rivera JA, de Cossio TG, Pedraza LS, et al. Childhood and adolescent overweight and obesity in Latin America: a systematic review. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014;2:321–332.

17. Yogev Y, Visser GH. Obesity, gestational diabetes and pregnancy outcome. *Semin Fetal Neonatal Med* 2009;14:77–84.
18. Fattah C, Barry S, O'Connor N, et al. Maternal leptin and body composition in the first trimester of pregnancy. *Gynecol Endocrinol* 2010;27:263–266.
19. Metzger BE, Persson B, Lowe LP, et al. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcome study: neonatal glycemia. *Pediatrics* 2010;126:e1545–e1552.
20. King JC. Maternal obesity, metabolism, and pregnancy outcomes. *Annu Rev Nutr* 2006;26:271–291.
21. Herrera E. Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. *Eur J Clin Nutr* 2000;54(suppl 1):S47–S51.
22. Herrera E. Implications of dietary fatty acids during pregnancy on placental, fetal and postnatal development—a review. *Placenta* 2002;23(suppl A):S9–S19.
23. Sullivan EL, Grove KL. Metabolic imprinting in obesity. *Forum Nutr* 2010;63:186–194.
24. Villar J, Cogswell M, Kestler E, et al. Effect of fat and fat-free mass deposition during pregnancy on birth weight. *Am J Obstet Gynecol* 1992;167:1344–1352.
25. Lopez-Luna P, Maier I, Herrera E. Carcass and tissue fat content in the pregnant rat. *Biol Neonate* 1991;60:29–38.
26. Lopez-Luna P, Munoz T, Herrera E. Body fat in pregnant rats at mid- and late-gestation. *Life Sci* 1986;39:1389–1393.
27. Herrera E. Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn. *Endocrine* 2002;19:43–55.
28. Gustafsson J. Neonatal energy substrate production. *Indian J Med Res* 2009;130:618–623.
29. Herrera E, Palacin M, Lopez-Luna P, et al. Carbohydrate-lipid interactions during gestation and their control by insulin. *Braz J Med Biol Res* 1994;27:2499–2519.
30. Ogatta ES. *Carbohydrate Metabolism During Pregnancy*. 3rd ed Philadelphia: Saunders; 2004.
31. Herrera E, Palacin M, Martin A, et al. Relationship between maternal and fetal fuels and placental glucose transfer in rats with maternal diabetes of varying severity. *Diabetes* 1985;34(suppl 2):42–46.
32. Herrera E, Lasuncion MA, Palacin M, et al. Intermediary metabolism in pregnancy. First theme of the Freinkel era. *Diabetes* 1991;40(suppl 2):S83–S88.
33. Philipps AF. Oxygen consumption and general carbohydrate metabolism of the fetus. In: *Fetal and Neonatal Physiology*. Philadelphia: Saunders; 2004. pp. 465–478.
34. Chaves JM, Herrera E. *In vitro* response of glycerol metabolism to insulin and adrenaline in adipose tissue from fed and fasted rats during pregnancy. *Biol Neonate* 1980;38:139–145.
35. Zorzano A, Lasuncion MA, Herrera E. Role of the availability of substrates on hepatic and renal gluconeogenesis in the fasted late pregnant rat. *Metabolism* 1986;35:297–303.
36. Herrera E, Lasuncion MA. Maternal-fetal transfer of lipid metabolites. In: Polin RA, Fox WW, Abman SH, eds. *Fetal and neonatal physiology*. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2004. pp. 375–388.
37. Martin-Hidalgo A, Holm C, Belfrage P, et al. Lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase activity and mRNA in rat adipose tissue during pregnancy. *Am J Physiol* 1994;266:E930–E935.
38. Herrera E, Gomez-Coronado D, Lasuncion MA. Lipid metabolism in pregnancy. *Biol Neonate* 1987;51:70–77.
39. Herrera E, Amusquivar E, Lopez-Soldado I, et al. Maternal lipid metabolism and placental lipid transfer. *Horm Res* 2006;65(suppl 3):59–64.
40. Montelongo A, Lasuncion MA, Pallardo LF, et al. Longitudinal study of plasma lipoproteins and hormones during pregnancy in normal and diabetic women. *Diabetes* 1992;41:1651–1659.
41. Ramos MP, Crespo-Solans MD, del Campo S, et al. Fat accumulation in the rat during early pregnancy is modulated by enhanced insulin responsiveness. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;285:E318–E328.
42. Herrera E, Ortega-Senovilla H. Maternal lipid metabolism during normal pregnancy and its implications to fetal development. *Clin Lipidol* 2010;5:899–911.
43. Butte NF, Wong WW, Treuth MS, et al. Energy requirements during pregnancy based on total energy expenditure and energy deposition. *Am J Clin Nutr* 2004;79:1078–1087.
44. Butte NF. Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 2000;71(5 suppl):1256S–1261S.
45. Catalano PM, Huston L, Amini SB, et al. Longitudinal changes in glucose metabolism during pregnancy in obese women with normal glucose tolerance and gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:903–916.
46. Sivan E, Chen X, Homko CJ, et al. Longitudinal study of carbohydrate metabolism in healthy obese pregnant women. *Diabetes Care* 1997;20:1470–1475.
47. Ehrenberg HM, Huston-Presley L, Catalano PM. The influence of obesity and gestational diabetes mellitus on accretion and the distribution of adipose tissue in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:944–948.
48. Visiedo F, Bugatto F, Sanchez V, et al. High glucose levels reduce fatty acid oxidation and increase triglyceride accumulation in human placenta. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013;305:E205–E212.
49. Jarvie E, Hauguel-de-Mouzon S, Nelson SM, et al. Lipotoxicity in obese pregnancy and its potential role in adverse pregnancy outcome and obesity in the offspring. *Clin Sci (Lond)* 2010;119:123–129.
50. Lappas M. Effect of pre-existing maternal obesity, gestational diabetes and adipokines on the expression of genes involved in lipid metabolism in adipose tissue. *Metabolism* 2014;63:250–262.
51. Ramsay JE, Ferrell WR, Crawford L, et al. Maternal obesity is associated with dysregulation of metabolic, vascular, and inflammatory pathways. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4231–4237.
52. Challier JC, Basu S, Bintein T, et al. Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta. *Placenta* 2008;29:274–281.
53. Galtier F, Raingeard I, Renard E, et al. Optimizing the outcome of pregnancy in obese women: from pregestational to long-term management. *Diabetes Metab* 2008;34:19–25.
54. Galtier-Dereure F, Boegner C, Bringer J. Obesity and pregnancy: complications and cost. *Am J Clin Nutr* 2000;71(5 suppl):1242S–1248S.
55. Zambrano E, Nathanielsz PW. Mechanisms by which maternal obesity programs offspring for obesity: evidence from animal studies. *Nutr Rev* 2013;71(suppl 1):S42–S54.
56. Gluckman PD, Hanson MA. Developmental origins of disease paradigm: a mechanistic and evolutionary perspective. *Pediatr Res* 2004;56:311–317.
57. Zambrano E, Guzman C, Rodriguez-Gonzalez GL, et al. Fetal programming of sexual development and reproductive function. *Mol Cell Endocrinol* 2014;382:538–549.
58. Rodriguez-Gonzalez GL, Vega CC, Boeck L, et al. Maternal obesity and overnutrition increase oxidative stress in male rat offspring reproductive system and decrease fertility. *Int J Obes (Lond)* 2015;39:549–556.
59. Rodriguez JS, Rodriguez-Gonzalez GL, Reyes-Castro LA, et al. Maternal obesity in the rat programs male offspring exploratory, learning and motivation behavior: prevention by dietary intervention pre-gestation or in gestation. *Int J Dev Neurosci* 2012;30:75–81.
60. Taylor PD, Poston L. Developmental programming of obesity in mammals. *Exp Physiol* 2007;92:287–298.
61. Zambrano E. The transgenerational mechanisms in developmental programming of metabolic diseases. *Rev Invest Clin* 2009;61:41–52.
62. Nijland MJ, Ford SP, Nathanielsz PW. Prenatal origins of adult disease. *Curr Treat Options Oncol* 2008;20:132–138.

63. Bayol SA, Farrington SJ, Stickland NC. A maternal 'junk food' diet in pregnancy and lactation promotes an exacerbated taste for "junk food" and a greater propensity for obesity in rat offspring. *Br J Nutr* 2007;98:843–851.
64. Reyes-Castro LA, Rodríguez-González GL, Chavira R, et al. Paternal line multigenerational passage of altered risk assessment behavior in female but not male rat offspring of mothers fed a low protein diet. *Physiol Behav* 2014;140C:89–95.
65. Skinner MK, Anway MD. Epigenetic transgenerational actions of vinclozolin on the development of disease and cancer. *Crit Rev Oncog* 2007;13:75–82.
66. Skinner MK. What is an epigenetic transgenerational phenotype? F3 or F2. *Reprod Toxicol* 2008;25:2–6.
67. Nathanielsz PW. *Life in the Womb: The Origin of Health and Disease*. Ithaca, NY: Prometheus Press; 1999.
68. Boney CM, Verma A, Tucker R, et al. Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. *Pediatrics* 2005;115:e290–e296.
69. Whitaker RC. Predicting preschooler obesity at birth: the role of maternal obesity in early pregnancy. *Pediatrics* 2004;114:e29–e36.
70. Yu Z, Han S, Zhu J, et al. Pre-pregnancy body mass index in relation to infant birth weight and offspring overweight/obesity: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2013;8:e61627.
71. Lau EY, Liu J, Archer E, et al. Maternal Weight Gain in Pregnancy and Risk of Obesity among Offspring: A Systematic Review. *J Obes* 2014;2014:524939.
72. Schack-Nielsen L, Michaelsen KF, Gamborg M, et al. Gestational weight gain in relation to offspring body mass index and obesity from infancy through adulthood. *Int J Obes (Lond)* 2010;34:67–74.
73. Ensenauer R, Chmitorz A, Riedel C, et al. Effects of suboptimal or excessive gestational weight gain on childhood overweight and abdominal adiposity: results from a retrospective cohort study. *Int J Obes (Lond)* 2013;37:505–512.
74. Chattingius S, Villamor E, Lagerros YT, et al. High birth weight and obesity—a vicious circle across generations. *Int J Obes (Lond)* 2012;36:1320–1324.
75. Mingrone G, Manco M, Mora ME, et al. Influence of maternal obesity on insulin sensitivity and secretion in offspring. *Diabetes Care* 2008;31:1872–1876.
76. Alfaradhi MZ, Ozanne SE. Developmental programming in response to maternal overnutrition. *Front Genet* 2011;2:1–13.
77. Oken E, Taveras EM, Kleinman KP, et al. Gestational weight gain and child adiposity at age 3 years. *Am J Obstet Gynecol* 2007;196:322.e1–322.e8.
78. George LA, Uthlaut AB, Long NM, et al. Different levels of overnutrition and weight gain during pregnancy have differential effects on fetal growth and organ development. *Reprod Biol Endocrinol* 2010;8:75.
79. Catalano PM, Presley L, Minium J, et al. Fetuses of obese mothers develop insulin resistance in utero. *Diabetes Care* 2009;32:1076–1080.
80. Gunderson EP. Childbearing and obesity in women: weight before, during, and after pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2009;36:317–332. ix.
81. Fraser A, Tilling K, Macdonald-Wallis C, et al. Association of maternal weight gain in pregnancy with offspring obesity and metabolic and vascular traits in childhood. *Circulation* 2010;121:2557–2564.
82. Mannan M, Doi SA, Mamun AA. Association between weight gain during pregnancy and postpartum weight retention and obesity: a bias-adjusted meta-analysis. *Nutr Rev* 2013;71:343–352.
83. Catalano PM, Ehrenberg HM. The short- and long-term implications of maternal obesity on the mother and her offspring. *BJOG* 2006;113:1126–1133.
84. Heerwagen MJR, Miller MR, Barbour LA, et al. Maternal obesity and fetal metabolic programming: a fertile epigenetic soil. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010;299:R711–R722.
85. DiCianni G, Miccoli R, Volpe L, et al. Maternal triglyceride levels and newborn weight in pregnant women with normal glucose tolerance. *Diabet Med* 2005;22:21–25.
86. Schaefer-Graf UM, Graf K, Kulbacka I, et al. Maternal lipids as strong determinants of fetal environment and growth in pregnancies with gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2008;31:1858–1863.
87. Sewell MF, Huston-Presley L, Super DM, et al. Increased neonatal fat mass, not lean body mass, is associated with maternal obesity. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195:1100–1103.
88. McCurdy CE, Bishop JM, Williams SM, et al. Maternal high-fat diet triggers lipotoxicity in the fetal livers of nonhuman primates. *J Clin Invest* 2009;119:323–335.
89. Fan L, Lindsley SR, Comstock SM, et al. Maternal high-fat diet impacts endothelial function in nonhuman primate offspring. *Int J Obes (Lond)* 2013;37:254–262.
90. Tuersunjiang N, Odhiambo JF, Long NM, et al. Diet reduction to requirements in obese/overfed ewes from early gestation prevents glucose/insulin dysregulation and returns fetal adiposity and organ development to control levels. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013;305:E868–E878.
91. Zambrano E, Martínez-Samayoá PM, Rodríguez-González GL, et al. Dietary intervention prior to pregnancy reverses metabolic programming in male offspring of obese rats. *J Physiol* 2010;588:1791–1799.
92. Samuelsson AM, Matthews PA, Argenton M, et al. Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. *Hypertension* 2008;51:383–392.
93. Ormoy A. Prenatal origin of obesity and their complications: gestational diabetes, maternal overweight and the paradoxical effects of fetal growth restriction and macrosomia. *Reprod Toxicol* 2011;32:205–212.
94. Vega CC, Reyes-Castro LA, Bautista CJ, et al. Exercise in obese female rats has beneficial effects on maternal and male and female offspring metabolism. *Int J Obes (Lond)* 2015;39:712–719.
95. Bayol SA, Simbi BH, Fowkes RC, et al. A Maternal "Junk Food" Diet in Pregnancy and Lactation Promotes Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Rat Offspring. *Endocrinology* 2010;151:1451–1461.
96. Bouanane S, Merzouk H, Benkalfat NB, et al. Hepatic and very low-density lipoprotein fatty acids in obese offspring of overfed dams. *Metabolism* 2010;59:1701–1709.
97. Gupta A, Srinivasan M, Thamadilok S, et al. Hypothalamic alterations in fetuses of high fat diet-fed obese female rats. *J Endocrinol* 2009;200:293–300.
98. Morris MJ, Chen H. Established maternal obesity in the rat reprograms hypothalamic appetite regulators and leptin signaling at birth. *Int J Obes (Lond)* 2009;33:115–1122.
99. Kirk SL, Samuelsson AM, Argenton M, et al. Maternal obesity induced by diet in rats permanently influences central processes regulating food intake in offspring. *PLoS One* 2009;4:e5870.
100. Nicholas LM, Rattanaray L, MacLaughlin SM, et al. Differential effects of maternal obesity and weight loss in the periconceptional period on the epigenetic regulation of hepatic insulin-signaling pathways in the offspring. *FASEB J* 2013;27:3786–3796.
101. Long NM, George LA, Uthlaut AB, et al. Maternal obesity and increased nutrient intake before and during gestation in the ewe results in altered growth, adiposity, and glucose tolerance in adult offspring. *J Anim Sci* 2010;88:3546–3553.
102. Kandadi MR, Hua Y, Zhu M, et al. Influence of gestational overfeeding on myocardial proinflammatory mediators in fetal sheep heart. *J Nutr Biochem* 2013;24:1982–1990.

103. Wang J, Ma H, Tong C, et al. Overnutrition and maternal obesity in sheep pregnancy alter the JNK-IRS-1 signaling cascades and cardiac function in the fetal heart. *FASEB J* 2010;24:2066–2076.
104. Srinivasan M, Aalinkel R, Song F, et al. Maternal hyperinsulinemia predisposes rat fetuses for hyperinsulinemia, and adult-onset obesity and maternal mild food restriction reverses this phenotype. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;290:E129–E134.
105. Bautista CJ, Montano S, Ramirez V, et al. Changes in milk composition in obese rats consuming a high-fat diet. *Br J Nutr* 2016;115: 538–546.
106. Desai M, Beall M, Ross MG. Developmental origins of obesity: programmed adipogenesis. *Curr Diab Rep* 2013;13:27–33.
107. McDonald TJ, Franko KL, Brown JM, et al. Betamethasone in the last week of pregnancy causes fetal growth retardation but not adult hypertension in rats. *J Soc Gynecol Investig* 2003;10: 469–473.
108. Benediktsson R, Lindsay RS, Noble J, et al. Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension. *Lancet* 1993;341:339–341.
109. Cleasby ME, Kelly PA, Walker BR, et al. Programming of rat muscle and fat metabolism by in utero overexposure to glucocorticoids. *Endocrinology* 2003;144:999–1007.
110. Nathanielsz PW, Ford SP, Long NM, et al. Interventions to prevent adverse fetal programming due to maternal obesity during pregnancy. *Nutr Rev* 2013;71(suppl 1):S78–S87.
111. Zambrano E, Reyes-Castro LA, Nathanielsz PW. Aging, glucocorticoids and developmental programming. *Age (Dordr)* 2015;37:9774.
112. Bouret SG, Simerly RB. Developmental programming of hypothalamic feeding circuits. *Clin Genet* 2006;70:295–301.
113. Grayson BE, Allen SE, Billes SK, et al. Prenatal development of hypothalamic neuropeptide systems in the nonhuman primate. *Neuroscience* 2006;143:975–986.
114. Adam CL, Findlay PA, Chanet A, et al. Expression of energy balance regulatory genes in the developing ovine fetal hypothalamus at mid-gestation and the influence of hyperglycemia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;294:R1895–R1900.
115. Long NM, Ford SP, Nathanielsz PW. Maternal obesity eliminates the neonatal lamb plasma leptin peak. *J Physiol* 2011;589: 1455–1462.
116. Chatzi L, Plana E, Daraki V, et al. Metabolic syndrome in early pregnancy and risk of preterm birth. *Am J Epidemiol* 2009;170:829–836.
117. Waterland RA, Travisano M, Tahiliani KG, et al. Methyl donor supplementation prevents transgenerational amplification of obesity. *Int J Obes (Lond)* 2008;32:1373–1379.
118. Keane D, Kelly S, Healy NP, et al. Diet and Metabolic Syndrome: An Overview. *Curr Vasc Pharmacol* 2014;11:842–857.
119. Kral JG, Biron S, Simard S, et al. Large maternal weight loss from obesity surgery prevents transmission of obesity to children who were followed for 2 to 18 years. *Pediatrics* 2006;118:e1644–e1649.
120. Donnelly JM, Walsh JM, Byrne J, et al. Impact of maternal diet on neonatal anthropometry: a randomized controlled trial. *Pediatr Obes* 2015;10:52–56.
121. McGowan CA, Walsh JM, Byrne J, et al. The influence of a low glycemic index dietary intervention on maternal dietary intake, glycemic index and gestational weight gain during pregnancy: a randomized controlled trial. *Nutr J* 2013;12:140.
122. Thangaratnam S, Rogozinska E, Jolly K, et al. Interventions to reduce or prevent obesity in pregnant women: a systematic review. *Health Technol Assess* 2012;16. iii–iv, 1–191.
123. Lapillonne A. Vitamin D deficiency during pregnancy may impair maternal and fetal outcomes. *Med Hypotheses* 2010;74:71–75.
124. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007;357: 266–281.
125. Bodnar LM, Catov JM, Roberts JM, et al. Prepregnancy obesity predicts poor vitamin D status in mothers and their neonates. *J Nutr* 2007;137:2437–2442.
126. Simopoulos AP. Importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids: evolutionary aspects. *World Rev Nutr Diet* 2003;92: 1–22.
127. Helland IB, Smith L, Blomen B, et al. Effect of supplementing pregnant and lactating mothers with n-3 very-long-chain fatty acids on children's IQ and body mass index at 7 years of age. *Pediatrics* 2008;122:e472–e479.
128. Hopkins SA, Artal R. The role of exercise in reducing the risks of gestational diabetes mellitus. *Womens Health (Lond Engl)* 2013;9: 569–581.
129. Sorensen TK, Williams MA, Lee IM, et al. Recreational physical activity during pregnancy and risk of preeclampsia. *Hypertension* 2003; 41:1273–1280.
130. Hegaard HK, Pedersen BK, Nielsen BB, et al. Leisure time physical activity during pregnancy and impact on gestational diabetes mellitus, pre-eclampsia, preterm delivery and birth weight: a review. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2007;86:1290–1296.
131. Thangaratnam S, Rogozinska E, Jolly K, et al. Effects of interventions in pregnancy on maternal weight and obstetric outcomes: meta-analysis of randomised evidence. *BMJ* 2012;344:e2088.
132. Ruiz JR, Perales M, Pelaez M, et al. Supervised exercise-based intervention to prevent excessive gestational weight gain: a randomized controlled trial. *Mayo Clin Proc* 2013;88:1388–1397.
133. Choi J, Fukuoka Y, Lee JH. The effects of physical activity and physical activity plus diet interventions on body weight in overweight or obese women who are pregnant or in postpartum: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Prev Med* 2013; 56:351–364.
134. Laker RC, Lillard TS, Okutsu M, et al. Exercise prevents maternal high-fat diet-induced hypermethylation of the Pgc-1alpha gene and age-dependent metabolic dysfunction in the offspring. *Diabetes* 2014;63:1605–1611.
135. Bautista-Castano I, Henriquez-Sanchez P, Aleman-Perez N, et al. Maternal obesity in early pregnancy and risk of adverse outcomes. *PLoS One* 2013;8:e80410.
136. Santos M, Rodriguez-Gonzalez GL, Ibanez C, et al. Adult exercise effects on oxidative stress and reproductive programming in male offspring of obese rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2015;308:R219–R225.
137. Tanentsapf I, Heitmann BL, Adegboye AR. Systematic review of clinical trials on dietary interventions to prevent excessive weight gain during pregnancy among normal weight, overweight and obese women. *BMC Pregnancy Childbirth* 2011;11:81.
138. Sui Z, Dodd JM. Exercise in obese pregnant women: positive impacts and current perceptions. *Int J Womens Health* 2013;5:389–398.

AGE (2014) 36:9721
DOI 10.1007/s11357-014-9721-5

Accelerated aging of reproductive capacity in male rat offspring of protein-restricted mothers is associated with increased testicular and sperm oxidative stress

Guadalupe L. Rodríguez-González · Luis A. Reyes-Castro · Claudia C. Vega · Lourdes Boeck · Carlos Ibáñez · Peter W. Nathanielsz · Fernando Larrea · Elena Zambrano

Received: 24 June 2014 / Accepted: 20 October 2014 / Published online: 30 October 2014
© American Aging Association 2014

Abstract Maternal protein restriction (MPR) in pregnancy causes life course organ dysfunction, but few studies link the developmental origins of disease hypothesis to early aging. Suboptimal developmental nutrition increases oxidative stress (OS) and male infertility, damaging sperm function. We hypothesized that MPR in pregnancy accelerates age-related changes in testicular and sperm function related to both maternal diet and increased testicular OS in rat offspring. We studied male rats whose pregnant mothers ate either control (C, 20 % casein) or restricted (R, 10 % casein) isocaloric diet. After birth, mothers and offspring ate C diet. Testes were retrieved at 19 days gestation and across the life course (postnatal day (PND) 21, 36, 110, and 850) to measure OS markers, antioxidant enzymes, serum FSH, LH, and testosterone, and PND 110 sperm OS and quality. Fertility rate was evaluated at PND 110,

450, and 850. Offspring showed age- and MPR-related changes in testosterone, testicular OS markers and antioxidant enzymes and fertility, and maternal diet-related OS and sperm antioxidant enzyme changes. Developmental programming is considered a key factor in predisposing to chronic disease. Our data show that programming also plays an important role in aging trajectory. This interaction is a little studied area in aging biology that merits more investigation.

Keywords Developmental programming · Testosterone · Sperm · Fertility · Aging · Maternal nutrition

Abbreviations

C	Control
dG	Days of gestation DCF 2',7'-dichlorofluorescein
FSH	Follicle-stimulating hormone
GPx	Glutathione peroxidase
LH	Luteinizing hormone
MDA	Malondialdehyde
OS	Oxidative stress
PND	Postnatal days
RIA	Radioimmunoassay
ROS	Reactive oxygen species
R	Restricted
SOD	Superoxide dismutase
TBARS	Thiobarbituric acid-reactive substances assay

G. L. Rodríguez-González · L. A. Reyes-Castro · C. C. Vega · L. Boeck · C. Ibáñez · F. Larrea · E. Zambrano (✉)
Reproductive Biology Department, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City 14000 Mexico, Mexico
e-mail: zamgon@yahoo.com.mx

P. W. Nathanielsz
Center for Pregnancy and Newborn Research; Department of Obstetrics, University of Texas Health Science Center San Antonio, San Antonio, TX 78229, USA

Adult exercise effects on oxidative stress and reproductive programming in male offspring of obese rats

Mery Santos,¹ Guadalupe L. Rodríguez-González,¹ Carlos Ibáñez,¹ Claudia C. Vega,¹
Peter W. Nathanielsz,² and Elena Zambrano¹

¹Reproductive Biology Department, National Institute of Medical Science and Nutrition, Salvador Zubiran, Mexico;

and ²Center for Pregnancy and Newborn Research, Department of Obstetrics, University of Texas Health Sciences Center San Antonio, Texas

Submitted 18 September 2014; accepted in final form 9 December 2014

Santos M, Rodríguez-González GL, Ibáñez C, Vega CC, Nathanielsz PW, Zambrano E. Adult exercise effects on oxidative stress and reproductive programming in male offspring of obese rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 308: R219–R225, 2015. First published December 10, 2014; doi:10.1152/ajpregu.00398.2014.—Exercise improves health but few data are available regarding benefits of exercise in offspring exposed to developmental programming. There is currently a worldwide epidemic of obesity. Obesity in pregnant women predisposes offspring to obesity. Maternal obesity has well documented effects on offspring reproduction. Few studies address ability of offspring exercise to reduce adverse outcomes. We observed increased oxidative stress and impaired sperm function in rat offspring of obese mothers. We hypothesized that regular offspring exercise reverses adverse effects of maternal obesity on offspring sperm quality and fertility. Female Wistar rats ate chow (C) or high-energy, obesogenic diet (MO) from weaning through lactation, bred at postnatal day (PND) 120, and ate their pregnancy diet until weaning. All offspring ate C diet from weaning. Five male offspring (different litters) ran on a wheel for 15 min, 5 times/week from PND 330 to 450 and were euthanized at PND 450. Average distance run per session was lower in MO offspring who had higher body weight, adiposity index, and gonadal fat and showed increases in testicular oxidative stress biomarkers. Sperm from MO offspring had reduced antioxidant enzyme activity, lower sperm quality, and fertility. Exercise in MO offspring decreased testicular oxidative stress, increased sperm antioxidant activity and sperm quality, and improved fertility. Exercise intervention has beneficial effects on adiposity index, gonadal fat, oxidative stress markers, sperm quality, and fertility. Thus regular physical exercise in male MO offspring recuperates key male reproductive functions even at advanced age: it's never too late.

developmental programming; oxidative stress; interventions; fertility.

EXERCISE IS WELL KNOWN to improve health (7, 43). Programming by adverse conditions during development is now well accepted as a major determinant of offspring life-course health. Developmental programming can be defined as the response to a specific challenge to the mammalian organism during a critical developmental time window that changes the trajectory of growth altering phenotype with resulting effects on health that can persist throughout life (14, 57). Developmental effects of suboptimal maternal nutrition have been extensively investigated (15, 28, 44) including programming resulting from maternal obesity (50).

Address for reprint requests and other correspondence: E. Zambrano, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15, Sección XVI, Tlalpan, 14000, México, D.F. México (e-mail: zamgon@unam.mx).

http://www.ajpregu.org

0363-6119/15 Copyright © 2015 the American Physiological Society

R219

Downloaded from www.physiology.org/journal/ajpregu (187.207.230.239) on September 19, 2019.

The incidence of obesity has increased substantially worldwide over recent years and obesity is now recognized as a major, universal health problem by organizations such as the World Health Organization (WHO) (53) with over 1.1 billion individuals throughout the world classified as obese (37). Increased prevalence of obesity is also reflected among women of reproductive age and recognized as a major complication in pregnant women (30, 55).


Maternal over nutrition and obesity during pregnancy and/or lactation affects offspring metabolic phenotype (56), cardiovascular function (46), anxiety behavior, associative learning, and motivation (36). In contrast, programming of offspring reproductive capacity by maternal obesity is poorly documented. We have reported that male offspring of pregnant rats fed a low-protein diet develop obesity and have lower sperm counts and a 50% decrease in fertility rate (58). At the other extreme of maternal nutrition, maternal over nutrition and obesity during pregnancy and lactation decreases sperm viability, motility, and concentration in adult male offspring accompanied by manifestation of increased testicular oxidative stress (35, 55). Female rat offspring from mothers fed with high-fat diet during pregnancy and lactation have earlier puberty onset (42), higher leptin and insulin serum levels (21), and altered reproductive function reflected in an increased incidence of prolonged or persistent estrus (10). Maternal obesity in humans leads to earlier onset of puberty (20) and affects semen quality in male offspring (34). In mice Founder generation F₀ paternal obesity compromises F₁ female pancreatic function (29). F₁ females oocytes show increased oxidative stress and altered mitochondrial function and F₁ males have altered sperm function with reduced motility, increased reactive oxygen species (ROS) levels, and decreased in vitro fertilization rates (13).

Human (23, 49) and animal studies (31, 38, 56) show that offspring of obese mothers are themselves predisposed to obesity. Obesity and male infertility have increased in parallel (25), which potentially explains the positive correlation between male obesity and low sperm quality and fertility (32). Human (8, 19, 45) and animal studies (33) show that spermatozooids from obese male have decreased motility, more morphological defects, increased DNA damage, and higher oxidative stress. While the etiology of male infertility is clearly multifactorial, oxidative stress is now considered to play an important role. In humans, paternal obesity is associated with increased oxidative stress in sperm (41), reduction in semen quality, and decreased fertility (6). Similarly, obese male rats have lower sperm quality and higher epididymal lipoperoxidation (48).



Article

Macrophage Populations in Visceral Adipose Tissue from Pregnant Women: Potential Role of Obesity in Maternal Inflammation

Eyerahi Bravo-Flores ^{1,2,†} , Ismael Mancilla-Herrera ³, Salvador Espino y Sosa ⁴, Marco Ortiz-Ramírez ⁵, Verónica Flores-Rueda ⁵, Francisco Iburgüengoitia-Ochoa ⁵, Carlos A. Ibañez ⁶, Elena Zambrano ⁶, Mario Solís-Paredes ⁷, Otilia Perichart-Perera ⁸, Maribel Sánchez-Martínez ¹, Diana Medina-Bastidas ¹, Enrique Reyes-Muñoz ⁹ and Guadalupe Estrada-Gutiérrez ^{10,*}

¹ Department of Immunobiochemistry, Instituto Nacional de Perinatología, 11000 Mexico City, Mexico; bravofloreseyerahi@gmail.com (E.B.-F.); maribel71sm@gmail.com (M.S.-M.); dianameedinab@gmail.com (D.M.-B.)

² Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 0451110 Mexico City, Mexico

³ Department of Infectology and Immunology, Instituto Nacional de Perinatología, 11000 Mexico City, Mexico; mahi_25803@yahoo.com.mx

⁴ Clinical Research Branch, Instituto Nacional de Perinatología, 11000 Mexico City, Mexico; salvadorespino@gmail.com

⁵ Department of Obstetrics, Instituto Nacional de Perinatología, 11000 Mexico City, Mexico; marco.ortiz@inper.gob.mx (M.O.-R.); verónica.flores@inper.gob.mx (V.F.-R.); drajosefinalira@yahoo.com.mx (F.I.-O.)

⁶ Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, 14080 Mexico City, Mexico; carlosalbertoibc@gmail.com (C.A.I.); zamgon@unam.mx (E.Z.)

⁷ Department of Human Genetics and Genomics, Instituto Nacional de Perinatología, 11000 Mexico City, Mexico; juan.mario.sp@gmail.com

⁸ Department of Nutrition and Bioprogramming, Instituto Nacional de Perinatología, 11000 Mexico City, Mexico; oti_perichart@yahoo.com

⁹ Endocrinology Division, Instituto Nacional de Perinatología, 11000 Mexico City, Mexico; dr.enriquereyes@gmail.com

¹⁰ Research Division, Instituto Nacional de Perinatología, 11000 Mexico City, Mexico

* Correspondence: gpestrad@gmail.com; Tel: +52-55-5520-9900

† E.B.F. is a doctoral student in the Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). This work is from a dissertation to be presented in partial fulfillment of the requirements for the Ph.D. degree.

Received: 15 February 2018; Accepted: 26 March 2018; Published: 4 April 2018



Abstract: Obesity is associated with inflammatory changes and accumulation and phenotype polarization of adipose tissue macrophages (ATMs). Obese pregnant women have alterations in adipose tissue composition, but a detailed description of macrophage population is not available. In this study, we characterized macrophage populations in visceral adipose tissue (VAT) from pregnant women with normal, overweight, and obese pregestational weight. Immunophenotyping of macrophages from VAT biopsies was performed by flow cytometry using CD45 and CD14 as markers of hematopoietic and monocyte lineage, respectively, while HLA-DR, CD11c, CD163, and CD206 were used as pro- and anti-inflammatory markers. Adipocyte number and size were evaluated by light microscopy. The results show that pregnant women that were overweight and obese during the pregestational period had adipocyte hypertrophy. Two different macrophage populations in VAT were identified: recruited macrophages (CD45⁺CD14⁺), and a novel population lacking CD45, which was considered to be a resident macrophages subset (CD45⁻CD14⁺). The number of resident HLA⁻DR^{low/-} macrophages showed a negative correlation with body mass index (BMI). Both resident and recruited macrophages from obese women expressed higher CD206 levels.

CD11c expression was higher in resident HLA-DR⁺ macrophages from obese women. A strong correlation between CD206 and CD11c markers and BMI was observed. Our findings show that being overweight and obese in the pregestational period is associated with adipocyte hypertrophy and specific ATMs populations in VAT.

Keywords: pregnancy; obesity; resident macrophage; recruited macrophage; inflammation; visceral adipose tissue

1. Introduction

Visceral adipose tissue (VAT) is considered to be an energy storage depot and has now been recognized as a highly active organ responsible for controlling numerous metabolic, hormonal, and immune processes [1–3]. Moreover, it is well-accepted that a large VAT mass is a main risk factor for developing metabolic dysfunction [4]. This tissue is constituted mainly by two components: (1) mature adipocytes that are responsible for controlling metabolism by storing excess calories as lipids as well as the production of endocrine hormones, such as leptin, resistin, and adiponectin [5]; and (2) stromal vascular fraction (SVF), which is a rich source of preadipocytes, endothelial cells, fibroblasts, mesenchymal cells, hematopoietic progenitor cells, and immune cells [6]. Of the heterogeneous leukocytes in VAT, macrophages are considered to be important contributors to adipose tissue maintenance, regulating immune and metabolic functions through cross-talk with adipocytes [7].

It has been demonstrated in animal models and human adipose tissue that macrophage phenotype is shaped by the microenvironment in the adipose tissue depots. Adipose tissue macrophage (ATM) accumulation and polarization from the anti-inflammatory (M2) to the pro-inflammatory (M1) phenotype have been associated with the metabolic and inflammatory changes that are the hallmarks of obesity [2,8].

On the other hand, the growing rates of overweight women at reproductive age and the increasing number of overweight or obese women beginning pregnancy are considered to be serious public health issues in the 21st century [9]. This has consequences in the mother and has subsequent effects on the child, leading to obesity, dyslipidemias, Type 2 diabetes, and hypertension later in life [10,11].

The potential role of ATMs in pregnancy as regulators of maternal inflammation is not yet fully understood. Therefore, the aim of this study was to characterize macrophage populations in VAT from pregnant women and to evaluate differences by weight status.



2. Materials and Methods

2.1. Patients and Donor Selection

Protocol 212250-3210-21002-06-15 was approved by the IRB of the Instituto Nacional de Perinatología in Mexico City. Each participant signed a written informed consent form.

A cross-sectional study was conducted from January 2016 to December 2016 at Instituto Nacional de Perinatología, Mexico City, Mexico. Women were recruited consecutively and written informed consent was obtained from each one. During this period, 1294 newborns were delivered by cesarean section at term (37–40 weeks of gestation by obstetric ultrasonography) in our institution. A total of 69 women met the inclusion criteria, 34 declined to participate in the study, it was not possible to obtain samples from 8 women, and 6 collected samples were insufficient for the experiments. Twenty-one healthy pregnant women with intact membranes, no clinical evidence of intrauterine infection, and normal weight gain during pregnancy were enrolled according to the inclusion criteria: age 20–40 years, pregestational Body Mass Index (BMI) >18.5 kg/m² and known pregestational weight. Exclusion criteria included diagnosis of gestational or pre-gestational diabetes, thyroid, hypertensive, or immunological disease, treatment with drugs that could affect metabolism or inflammation during

Maternal obesity has sex-dependent effects on insulin, glucose and lipid metabolism and the liver transcriptome in young adult rat offspring

Consuelo Lomas-Soria^{1,2}, Luis A. Reyes-Castro¹ , Guadalupe L. Rodríguez-González¹, Carlos A. Ibáñez¹, Claudia J. Bautista¹, Laura A. Cox^{3,4} , Peter W. Nathanielsz^{5,6}  and Elena Zambrano¹ 

¹Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15, Belisario Domínguez, Tlalpan, México, D.F. 14080, México

²CONACyT, Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición SZ, México

³Department of Internal Medicine, Section of Molecular Medicine, Wake Forest University School of Medicine, Winston-Salem, NC, USA

⁴Southwest National Primate Research Center, Texas Biomedical Research Institute, San Antonio, TX, USA

⁵Department of Animal Science, University of Wyoming, Laramie, WY, USA

⁶Department of Genetics, Texas Biomedical Research Institute, San Antonio, TX, USA

Edited by: Laura Bennet & Fiona Gribble

Key points

- Maternal high-fat diet consumption predisposes to metabolic dysfunction in male and female offspring at young adulthood.
- Maternal obesity programs non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in a sex-dependent manner.
- We demonstrate sex-dependent liver transcriptome profiles in rat offspring of obese mothers.
- In this study, we focused on pathways related to insulin, glucose and lipid signalling.
- These results improve understanding of the mechanisms by which a maternal high-fat diet affects the offspring.

Abstract Maternal obesity (MO) predisposes offspring (F1) to obesity, insulin resistance (IR) and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). MO's effects on the F1 liver transcriptome are poorly understood. We used RNA-seq to determine the liver transcriptome of male and female F1 of MO and control-fed mothers. We hypothesized that MO-F1 are predisposed to sex-dependent adult liver dysfunction. Female Wistar rat mothers ate a control (C) or obesogenic (MO) diet from the time they were weaned through breeding at postnatal day (PND) 120, delivery and lactation. After weaning, all male and female F1 ate a control diet. At PND 110, F1 serum, liver and fat were collected to analyse metabolites, histology and liver differentially expressed genes. Male and female MO-F1 showed increased adiposity index, triglycerides, insulin and homeostatic model

Consuelo Lomas received her PhD from Queretaro University (2012). She undertook postdoctoral training with Dr Peter Nathanielsz (2013–2015) and currently holds a permanent position with CONACyT in the National Institute of Nutrition of Mexico with Dr Elena Zambrano. The work presented in this article was initiated during her postdoctoral training analysing transcriptomic changes in offspring through bioinformatic analysis of RNA-seq data. Her work focuses on potential mechanisms of programming by maternal obesity and prevention of adverse outcomes in male and female offspring. This knowledge is important for designing sex-specific interventions. She proposes further investigations to determine developmental programming-ageing interactions.



assessment vs. C-F1 with similar body weight and glucose serum concentrations. MO-F1 males presented greater physiological and histological NAFLD characteristics than MO-F1 females. RNA-seq revealed 1365 genes significantly changed in male MO-F1 liver and only 70 genes in female MO-F1 compared with controls. GO and KEGG analysis identified differentially expressed genes related to metabolic processes. Male MO-F1 liver showed the following altered pathways: insulin signalling (22 genes), phospholipase D signalling (14 genes), NAFLD (13 genes) and glycolysis/gluconeogenesis (7 genes). In contrast, few genes were altered in these pathways in MO-F1 females. In summary, MO programs sex-dependent F1 changes in insulin, glucose and lipid signalling pathways, leading to liver dysfunction and insulin resistance.

(Received 25 April 2018; accepted after revision 15 June 2018; first published online 23 July 2018)

Corresponding author E. Zambrano: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15, Belisario Domínguez, Tlalpan, México, D.F. 14080, México. Email: zamgon@yahoo.com.mx

Introduction

Obesity rates, including those in pregnant women and young children, are increasing exponentially. Thus, understanding the mechanisms underlying this epidemic is of great economic and social importance in developed and developing countries. Obesity is related to metabolic diseases, including non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD; Li *et al.* 2015). NAFLD is an endocrine and metabolic liver disease, characterized by an excess of liver fat deposition (>5% weight or volume) in the absence of alcohol intake, insulin resistance (IR), increased triglycerides (TG), metabolic dysfunction and increased visceral fat (Li *et al.* 2015; Temple *et al.* 2016). NAFLD occurs in approximately 30% of obese individuals (Bellentani & Marino, 2009). It is estimated that by the year 2030 the prevalence of NAFLD will increase by 50%.

NAFLD is the commonest liver disease, affecting both adults and children. There is considerable evidence that maternal obesity (MO) increases offspring (F1) IR and adiposity (McCurdy *et al.* 2009; Modi *et al.* 2011; Alfaradhi *et al.* 2014). Unless checked, the current epidemic of obesity in women of reproductive years as well as childhood obesity (by transgenerational transmission) will inevitably predispose future generations of children and young adults to NAFLD. It is predicted that NAFLD will become the leading cause of liver failure in early life in developed countries (Temple *et al.* 2016).

Human epidemiological and controlled animal studies have demonstrated that MO has major adverse effects on the pregnant mother and her F1. A maternal obesogenic environment predisposes F1 to obesity and metabolic syndrome. Our previous studies demonstrate that rats fed an obesogenic diet after weaning and during pregnancy and lactation showed altered maternal metabolic function (Vega *et al.* 2015), liver lipids and milk composition (Bautista *et al.* 2016). In addition, their F1 develop adverse pancreatic (Zambrano *et al.* 2016), brain (Rodríguez *et al.* 2012) and reproductive organ structure and function (Rodríguez-González *et al.* 2015; Santos *et al.* 2015).

Several studies have demonstrated that maternal high-fat diet consumption during fetal development affects F1 long-term health and predisposes F1 to fatty liver disease in humans (Modi *et al.* 2011; Brumbaugh & Friedman, 2014), non-human primates (McCurdy *et al.* 2009; Thorn *et al.* 2014; Puppala *et al.* 2018) and rodents (Bayol *et al.* 2010; Gregorio *et al.* 2010; Mouralidarane *et al.* 2013; Alfaradhi *et al.* 2014; Pereira *et al.* 2015; Seet *et al.* 2015; Soeda *et al.* 2017; Wankhade *et al.* 2017). Both gene array and RNA-seq approaches have been used to evaluate challenges and outcomes of developmental programming by MO in placenta (Saben *et al.* 2014), white adipose tissue (Borengasser *et al.* 2013) and liver (Shankar *et al.* 2010; Mischke *et al.* 2013; Wankhade *et al.* 2017).

Studies by ourselves and others have demonstrated sex differences in F1 outcomes of programming by MO (Riant *et al.* 2009; Bayol *et al.* 2010; Hogg *et al.* 2011; Burgueno *et al.* 2013; Mischke *et al.* 2013; Vega *et al.* 2015; Bautista *et al.* 2016). Sex-specific changes are often more pronounced in male than female offspring (Aiken & Ozanne, 2013). Models of MO in rodents and sheep show sex-specificity; male F1 show more severe liver disease compared to female F1 (Riant *et al.* 2009; Bayol *et al.* 2010; Hogg *et al.* 2011; Burgueno *et al.* 2013; Mischke *et al.* 2013).

We hypothesized that MO programs F1 liver gene expression with dysfunctional metabolic outcomes in a sex-dependent manner. To address this hypothesis, we undertook analysis of postnatal growth and circulating metabolites and performed liver RNA-seq analysis in male and female F1 rats at a young adult age to investigate the differential gene expression profiles between liver MO-F1 and C-F1.

Methods

Care and maintenance of animals

All procedures were approved by the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) Animal Experimentation Ethics Committee

El perfil de expresión de genes adipogénicos en ratas macho descendientes de madres obesas está relacionado a la patogénesis de la resistencia a la insulina (Cartel)



El perfil de expresión de genes adipogénicos en ratas macho descendientes de madres obesas está relacionado a la patogénesis de la resistencia a la insulina

M. en C. Carlos Alberto Ibáñez Chávez¹, Dra. Consuelo Lomas Soria¹, M. en C. Eyerahí Bravo Flores², Dr. Mario Solís², Gimena Juárez Pílares¹, Dra. Guadalupe Estrada Gutiérrez², Dra. Elena Zambrano González¹.
¹Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
²Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinoza de los Reyes



RESUMEN (D13B)

Introducción: La obesidad materna (OM) está asociada al desarrollo de la hipertrofia del tejido adiposo visceral en los descendientes (F1). Sin embargo, la regulación de la expresión del tejido adiposo y sus consecuencias metabólicas en respuesta a la OM no está bien entendida.
Objetivo: Determinar cambios en la expresión de genes implicados en la diferenciación y mantenimiento de los adipocitos maduros en machos descendientes de madres obesas (OMF).
Materiales y Métodos: Se utilizó un ratón macho de la cepa Wistar (F0) que fueron distribuidos desde los 21 días postnatales (DPN) ya sea con dieta control (C-Medida) o con dieta obesogénica de alto contenido energético (OM-Ricco). Todos los machos F1 fueron asociados con machos no experimentales a los 120 DPN. Los descendientes macho de ambos grupos fueron distribuidos con dieta C (n=8 por cada grupo) y controlados de acuerdo al grupo materno. A los 110 DPN, un macho de cada camada fue eutanaziado. Asimismo, se determinó el índice de adiposidad (Índice de grasa visceral/Índice de peso corporal), el índice de resistencia a la insulina (IRI) y las concentraciones de leptina y triglicéridos (TG). En muestras de tejido adiposo retroperitoneal, se determinó el tamaño del adipocito como el área transversal medida en cortes histológicos y la expresión de 88 genes relacionados con la regulación de la adipogénesis en un arreglo de qPCR. Datos con p<0.05 y estadísticamente en el caso de los genes, expresión mayor o menor a 2 veces a expresión del C fueron considerados estadísticamente significativos.
Resultados: Los descendientes de madres obesas tuvieron mayor índice de adiposidad e hipertrofia del tejido adiposo con concentraciones elevadas de leptina y triglicéridos, además, la expresión de genes Agt, Fasn, Mapk14, Ppara, Slc2a4, Tcf7l2, Wnt5b fue disminuida respecto al C (Tabla 1).
Tabla 1. Genes diferencialmente expresados en el tejido adiposo retroperitoneal de ratas macho descendientes de madres obesas.

Gen	Símbolo	Expresión (en veces de cambio)	Valor P	Proceso biológico asociado
Resistina	Retn	-2.94	0.02	Adipocina
Corresor 1 de receptor nuclear	Ncor1	-2.44	0.03	Antiadipogénesis
Factor de transcripción 7 tipo 2	Tcf7l2	-2.06	0.05	Antiadipogénesis
Angiotensinógeno	Agt	5.91	0.03	Hormona
Miembro 5B de la familia Wnt	Wnt5b	-5.95	0.03	Adipogénesis
Sintasa de ácidos grasos	Fasn	-2.77	0.03	Adipogénesis
Miembro 4 de la familia 2 de los transportadores de soluto	Slc2a4	-4.04	0.01	Adipogénesis
Receptor o activado por proliferao de peroxisomas	Ppara	-2.12	0.05	Adipogénesis (tejido adiposo marrón)
Proteína cinasa activada por mitógeno 14	Mapk14	-2.1	0.03	Adipogénesis (tejido adiposo marrón)

Conclusión: La disminución en la expresión de genes asociados al metabolismo de la glucosa como la Slc2, sugiere que la resistencia a la insulina en los descendientes de madres obesas se debe en gran medida a alteraciones en el perfil de expresión adipogénica programado por la dieta materna.

INTRODUCCIÓN

Se ha demostrado con modelos experimentales con animales que los descendientes de madres obesas desarrollan hipertrofia del tejido adiposo, la cual está asociada con efectos adversos en el metabolismo de lípidos y glucosa. Sin embargo, los mecanismos por los cuales se produce la hipertrofia del tejido adiposo visceral en respuesta a la obesidad materna no está bien entendidos.

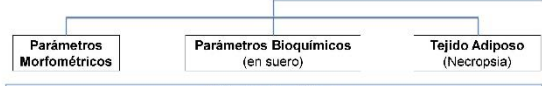
OBJETIVO

Determinar cambios en la expresión de genes implicados en la diferenciación y mantenimiento de adipocitos maduros en los descendientes de madres obesas.

MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO EXPERIMENTAL

GRUPOS EXPERIMENTALES	MADRES (F0)	MACHOS DESCENDIENTES (F1)
Control (C)	CONTROL	DIETA CONTROL
Obesidad Materna (MO)	DIETA ALTA EN GRASA	DIETA CONTROL



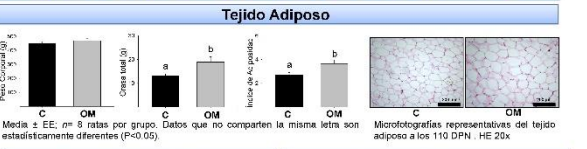
Métodos Analíticos

- Adiposidad:** Índice de Adiposidad (Grasa visceral/100/Peso corporal), Tamaño del adipocito, Expresión de 88 genes adipogénicos.
- Tejido Adiposo:** Necropsia, Histología, Arreglo de qPCR.
- Parámetros Bioquímicos (en suero):** Glucosa, Triglicéridos (TG), Leptina, Insulina, Ensayos enzimáticos, Radioinmunoanálisis.

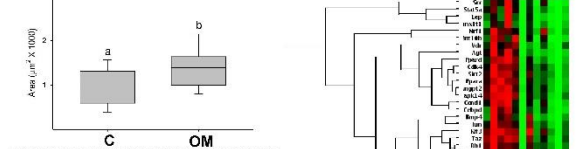
CONCLUSIÓN

La disminución en la expresión de genes asociados al metabolismo de la glucosa como la Slc2, sugiere que la resistencia a la insulina en los descendientes de madres obesas se debe en gran medida a alteraciones en el perfil de expresión adipogénica programado por la dieta materna.

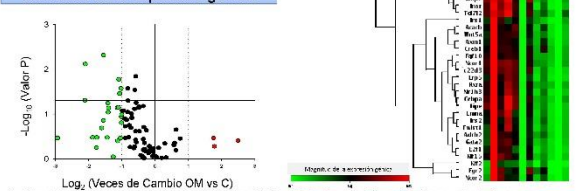
RESULTADOS DE LOS MACHOS F1 a los 110 DPN



Tamaño del Adipocito



Perfil de Expresión

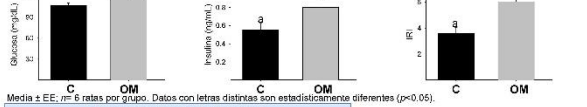


Cambios transcripcionales entre los machos F1 OM vs F1 C. Se muestran todos los genes presentes al arreglo de qPCR de Adipogénesis de Rata (PARN-Z49C, Qiagen). Niveles de expresión codificados en color (rojo para genes regulados a la alza o verde para genes regulados a la baja) en los animales C y MO. n:8 animales por grupo.

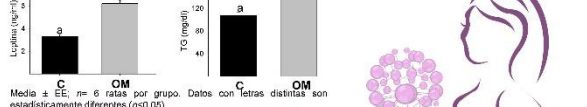
Expresión diferencial de genes adipogénicos

Gen	Símbolo	Expresión (en veces de cambio)	Valor-P	Proceso biológico asociado
Resistina	Retn	-2.94	0.02	Adipocina
Corresor 1 de receptor nuclear	Ncor1	-2.44	0.03	Antiadipogénesis
Factor de transcripción 7 tipo 2	Tcf7l2	-2.06	0.05	Antiadipogénesis
Angiotensinógeno	Agt	5.91	0.03	Hormona
Miembro 5B de la familia Wnt	Wnt5b	-5.95	0.03	Adipogénesis
Sintasa de ácidos grasos	Fasn	-2.77	0.03	Adipogénesis
Miembro 4 de la familia 2 de los transportadores de soluto	Slc2a4	-4.04	0.01	Adipogénesis
Receptor o activado por proliferao de peroxisomas	Ppara	-2.12	0.05	Adipogénesis (tejido adiposo marrón)
Proteína cinasa activada por mitógeno 14	Mapk14	-2.1	0.03	Adipogénesis (tejido adiposo marrón)

Metabolismo de la glucosa



Metabolismo de lípidos





INSTITUTO NACIONAL
DE PERINATOLOGÍA
ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES

INPer
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN



otorgan el

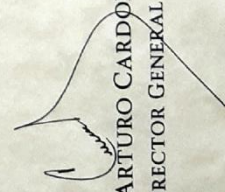
PREMIO AL PRIMER LUGAR CATEGORÍA DOCTORADO

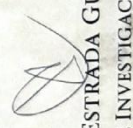
^a
Carlos Alberto Ibáñez Chávez

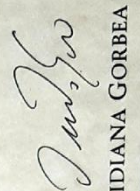
por el trabajo

El perfil de expresión de genes adipogénicos en ratas macho descendientes de madres obesas está relacionado a la patogénesis de la resistencia a la insulina

Ciudad de México, 24 de abril de 2018


DR. JORGE ARTURO CARDONA PÉREZ
DIRECTOR GENERAL


DRA. GUADALUPE ESTRADA GUTIÉRREZ
DIRECTORA DE INVESTIGACIÓN


DRA. VIRIDIANA GORBEA CHÁVEZ
DIRECTORA DE EDUCACIÓN
EN CIENCIAS DE LA SALUD