



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE PSICOLOGÍA**

**“EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN  
GESTACIONAL A UNA DIETA ALTA EN GRASAS SOBRE LAS  
INTERACCIONES TRÓFICAS ENTRE EL CUERPO Y EL  
CEREBRO: EL CASO DE LA ONTOGENIA MUSCULAR”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADA EN PSICOLOGÍA**

**P R E S E N T A:**

**GEOVANNA SARAHÍ DÍAZ OLIVARES**

**DIRECTOR: DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA**

**ASESOR: D. en C. ISAAC GONZÁLEZ SANTOYO**

**SINODALES: D. en C. FRUCTUOSO AYALA GUERRERO**

**DR. HUGO SÁNCHEZ CASTILLO**

**MTRO. JOSÉ ANTONIO HERNÁNDEZ SANTOS**



**Facultad  
de Psicología**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., JUNIO 2023.**



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.

## Agradecimientos

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por darme la oportunidad de formarme como profesionalista, me siento orgullosa de pertenecer a la máxima casa de estudios. Por mi raza hablará el espíritu, ¡Goya!

Al **Instituto de Investigaciones Biomédicas**, por permitirme realizar mi proyecto de tesis e inspirarme a seguir creciendo y aprendiendo.

A la **Coordinación de Psicobiología y Neurociencias** de la **Facultad de Psicología**, por apoyarme y orientarme en mi proceso de titulación.

Al **Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina** por maravillarme de la ciencia en cada clase y charla, por darme el apoyo y la confianza de trabajar contigo.

Al **Dr. Antonio Paulino Zainos Rosales**, por su apoyo incondicional dentro y fuera del aula. Muchas gracias por su autenticidad y afecto al enseñar.

A la **M. en C. Rosa Nuria Galindo Solano**, por el inmensa enseñanza, paciencia y orientación en el laboratorio, ¡infinitas gracias!

Al **Dr. Miguel Tapia Rodríguez**, por la ayuda técnica en microscopia, sus enseñanzas y su agradable compañía.

Al **Dr. Jesús Ramírez Santos**, por su apoyo técnico en el laboratorio y las pláticas constructivas.

A la **Dra. Margarita Gómez Chavarín**, por su ayuda en el laboratorio, enseñanzas, paciencia y confianza.

Al **Dr. Isaac González Santoyo**, por sus interesantes clases y valiosas aportaciones para el enriquecimiento del proyecto.

Al **Dr. Fructuoso Ayala Guerrero**, por sus increíbles clases sobre psicofisiología del sueño y sus contribuciones al proyecto.

Al **Dr. Hugo Sánchez Castillo**, por demostrar que la docencia puede ser divertida y exigente a la vez, agradezco sus enseñanzas.

Al **Mtro. José Antonio Hernández Santos**, por el gran gusto de conocerlo y ser parte de mi sínodo, sus aportaciones favorecieron mucho al proyecto.

A la **M. en C. Gabriela Xóchitl Ayala Méndez**, por su asesoría en el manejo de animales de laboratorio.

A la **Dra. Eva Mendoza del Laboratorio de Biología Tisular y Reproductora de la Facultad de Ciencias**, por su apoyo técnico y asesoría en la implementación de la técnica de tinción de rojo oleoso.

## **Dedicatorias**

*Siempre hay que encontrar el tiempo para agradecer a las personas que hacen una diferencia en nuestra vida...*

*.... a todas ellas van dirigidas estas palabras.*

*A **Dulce y Juan Carlos**, mis padres, les agradezco por siempre apoyarme, por creer en mí y ayudarme a llegar a donde estoy y donde estaré. Mis logros son y serán suyos también, los amo.*

*A **Carlos Alberto y Juan Pablo**, mis hermanos, los mejores compañeros de vida.*

*A mi **Mami, Juan de Dios, Paco, Angy y Mariel**, la familia es el tesoro más grande, ustedes son el mío.*

*A **Nuria**, los mejores maestros enseñan desde el corazón y tú posees uno enorme. Gracias por todo el conocimiento y aprendizaje que me brindaste, pero sobre todo gracias por tu invaluable amistad.*

*A los **animales de laboratorio**, gracias a ellos la ciencia es posible.*

*A ti **Geo**, porque cuando creíste que no podías más, siempre lograste más, mucho más.*

## Índice

1. Resumen .....	1
2. Introducción.....	2
3. Antecedentes .....	4
3.1. Los orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad (DOHaD).....	4
3.2. DOHaD y Obesidad.....	4
3.3. Teoría trófica de las conexiones neurales.....	7
4. Justificación .....	11
5. Objetivo general .....	11
5.1. Objetivos específicos.....	11
6. Hipótesis.....	12
7. Materiales y Métodos .....	12
7.1. Animales y diseño experimental .....	12
7.2. Periodo de gestación .....	13
7.3. Obtención y procesamiento de las muestras .....	14
7.4. Identificación de características histológicas .....	15
a) Tinción de hematoxilina y eosina (H-E) .....	15
b) Reacción de citocromo oxidasa .....	15
c) Acetilcolinesterasa .....	16
d) Tinción de rojo oleoso.....	17
8. Análisis de imágenes.....	17
9. Análisis estadístico .....	22
10. Resultados .....	23
10. 1. Somatometría, eficiencia gestacional y eficacia reproductiva .....	23

10.2. Volumen muscular .....	24
10.3. Metabolismo oxidativo muscular.....	24
10.4. Parámetros morfo-funcionales de la placa neuromuscular .....	26
10.5. Infiltración de vacuolas lipídicas .....	29
11. Discusión.....	31
12. Anexos .....	35
13. Referencias .....	37

## Resumen

Tradicionalmente se piensa que los estados considerados como fisiopatológicos manifestados en la vida adulta resultan del impacto negativo que la carga alostática crónica tiene sobre el cuerpo a partir del nacimiento. Sin embargo, existe evidencia que soporta que las manifestaciones fisiopatológicas postnatales establecen sus raíces durante la gestación debido, en parte, a la capacidad del feto para registrar los eventos adversos y traducirlos en su fenotipo. Esta habilidad, se piensa, les permite a los fetos “hacer conjeturas” sobre el tipo de condiciones que enfrentará a partir del nacimiento, situación que condiciona su trayectoria de desarrollo y maduración pre- y postnatal, al modificar el trofismo neuromuscular durante la gestación. Consideramos que esta situación subyace a las distrofias musculares asociadas a la obesidad infantil. Por ello, el presente proyecto instrumentó una estrategia que permitió proveer evidencia empírica circunstancial a favor de la posibilidad referida, utilizando a los músculos cuádriceps e isquiotibiales de las extremidades traseras de los embriones de fetos de rata expuestos a dietas altas en grasa, como unidades experimentales.

Los resultados sugieren que la sobreexposición nutrimental pregestacional de la madre y la exposición gestacional en el feto a dietas altas en grasas podría modificar las interacciones tróficas neuromusculares en los fetos a término de la gestación. Este estudio sienta las bases para especular que la alteración de las interacciones tróficas neuromusculares pudiese, a través de mecanismos epigenéticos, condicionar el estado de salud-enfermedad del individuo en la vida adulta.



## Introducción

Por años se ha concebido que el desarrollo de condiciones consideradas patológicas en la vida adulta se debe al estrés alostático que el organismo acumula a lo largo de su vida postnatal. Sabemos, sin embargo, que el ambiente gestacional puede predisponer al organismo a padecer múltiples enfermedades crónicas como la diabetes, hipertensión y obesidad en la edad adulta (Cabana et al., 2020).

En particular, las adaptaciones morfofuncionales que desarrolla el feto en respuesta a estados nutricionales carenciales o como consecuencia del sobre abastecimiento nutrimental, influyen de manera permanente sobre las respuestas anatómo-fisiológicas accionadas por el organismo ante retos específicos que se presenten en la vida extrauterina (Garibay-nieto & Miranda-lora, 2008). Así, los fetos desarrollan fenotipos adaptativos/predictivos que auguran las condiciones que enfrentarán a lo largo de su vida una vez que nazcan. Tal parece ser el caso con relación al exceso de ingesta materna de grasas durante la gestación, pues esta condiciona la acumulación postnatal de grasa en diversos tejidos de las crías (Ashino et al., 2012; Hoffman et al., 2017).

Específicamente, se ha observado que las crías de madres obesas desarrollan esta misma condición en edades muy tempranas, y que tienen un mayor riesgo a padecer condiciones metabólico-degenerativas en órganos de los sistemas circulatorio, endocrino, inmunitario, nervioso, articular y muscular (Castro et al., 2002; Lepe et al., 2011; Paul et al., 2015; Rizzo & Sen, 2015; Stothard et al., 2009; Tenenbaum-Gavish & Hod, 2013). Con relación a estas últimas, diversos estudios reportan que niños diagnosticados con obesidad, presentan debilidad e hipotrofia muscular desarrollada en respuesta al daño en los nervios periféricos motores, autónomos y sensoriales (Akin et al., 2016; Baum et al., 2013; de Sá Pinto et al., 2006; Ince et al., 2015; Krul et al., 2009; Perea-Martínez et al., 2009; Pillen et al., 2003; Ruíz et al., 2015; Stovitz et al., 2008). Estas observaciones apoyan la idea de que el trofismo neuromuscular se modifica prenatalmente, como resultado de la exposición excesiva a nutrientes durante la gestación. En apoyo a la posibilidad planteada, Bayol y colaboradores (2005) examinaron los efectos de una dieta de

cafetería materna (alimentos procesados con un alto contenido de grasa y/o azúcar, incluidos muffins, rosquillas de mermelada, bizcochos, queso, malvaviscos, papas fritas y barras de chocolate, además de comida para ratas), sobre el músculo esquelético y el desarrollo del tejido adiposo en la descendencia al destete. Las ratas nacidas de madres alimentadas con la dieta de la cafetería reportaron una reducción del 25 % en el área transversal del músculo semitendinoso a los 21 días de vida. Este músculo presentó 20 % menos fibras, y el doble de infiltración de tejido adiposo en comparación con las crías alimentadas con una dieta regular.

Con este ejemplo, es probable pensar que las interacciones tróficas entre el cuerpo y el cerebro constituyan un elemento central en el proceso de desarrollo ontogénico de los organismos complejos. Estas relaciones permiten crear consonancia morfofuncional entre el cuerpo y el cerebro, en respuesta a las condiciones en la que esta diada se desarrolla durante la gestación. Con la finalidad de inferir si las interacciones tróficas median la aparición de fenotipos predictivo/adaptativos en fetos desarrollados bajo condiciones de nutrimentales inadecuadas, en el presente proyecto exploramos cuali-cuantitativamente el desarrollo neuromuscular en las extremidades posteriores de fetos expuestos a una dieta alta en grasas, derivado de la alimentación de las madres antes y durante la etapa gestacional.

## **Antecedentes**

### ***Los orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad (DOHaD)***

En los años 80's, Barker y colaboradores (1986) mostraron que fetos sometidos a desnutrición disminuyen su tasa de crecimiento corporal mientras que el tamaño del cerebro se conserva. Este cambio, condujo a alteraciones metabólicas y endocrinas que incrementan la susceptibilidad de los individuos afectados a desarrollar enfermedades en la vida postnatal. Las observaciones iniciales publicadas por el grupo de Baker han sido corroboradas al transcurrir de los años, y han dado paso a la consolidación de una teoría conocida como los “Orígenes del Desarrollo de la Salud y la Enfermedad” (DOHaD por sus siglas en inglés, Developmental Origins of Health and Disease; (Cabana et al.,2020).

Diversos son los factores ambientales externos e internos de la madre que afectan el desarrollo del feto. Entre ellos cabe destacar a diversos fármacos, contaminantes, ondas electromagnéticas, y a la disbiosis. Aunado a lo anterior, el estrés mental y físico materno durante el embarazo también influyen negativamente sobre el desarrollo del feto. Como resultado de la exposición a todos estos factores aparecen, durante la vida postnatal, afecciones en los sistemas cardiovascular, endocrino, respiratorio, renal, gastrointestinal, reproductivo, muscular y nervioso (Suzuki, 2018). En este contexto, dado que estudios experimentales han demostrado que la sobrenutrición durante el período gestacional se asocia con un mayor riesgo de aparición de obesidad y síndrome metabólico en la edad adulta (Armitage et al., 2008; Garibay-nieto & Miranda-lora, 2008; Ismail-Beigi et al., 2006), resulta innegable que la nutrición durante el embarazo condiciona el estado de salud-enfermedad a partir del nacimiento.

### ***DOHaD y Obesidad***

La obesidad es una enfermedad crónica degenerativa, prevalente en todos los grupos etarios, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. En la actualidad, se define como obesidad a la condición corporal que se caracteriza por

la acumulación excesiva de tejido adiposo. Esta acumulación se estima mediante el índice de masa corporal ( $IMC = PC \text{ (Kg)} / A \text{ (cm}^2\text{)}$ ), presumiendo que valores de entre 20–24.9 son normales, de entre 25–29.9 representan sobrepeso moderado y de 30 o mayores son característicos de individuos obesos (OMS, 2021). No obstante que el foco de atención ha sido puesto en el contenido graso corporal, la obesidad es considerada como una enfermedad multifactorial asociada a factores bióticos y abióticos que interactúan. Aunque tradicionalmente se ha considerado que la obesidad resulta del desbalance entre la ingesta y el gasto calórico durante la vida postnatal, estudios recientes sugieren que la exposición excesiva a nutrientes durante la gestación explica las crecientes tasas y el desarrollo prematuro de obesidad infantil observada actualmente (Garibay-nieto & Miranda-lora, 2008, Bayol et al., 2005, Castro et al., 2020). El fenómeno descrito es importante epidemiológicamente pues, en México, el 51 % de las mujeres en edad reproductiva presenta sobrepeso u obesidad, y se estima que la prevalencia de obesidad durante el embarazo es de 17.6 a 27.7 % (Ramírez et al., 2019), situación que incrementa el riesgo de sus hijos a desarrollar patologías severas después del nacimiento (Cuadro 1; Cervantes Ramírez et al., 2019)

**Cuadro 1**

*Alteraciones fetales relacionadas con obesidad materna.*

<b>Alteraciones</b>	<b>Autor</b>
Asma y sibilancias.	Rizzo et. al, 2015
Desarrollo de obesidad, síndrome metabólico, hipertensión, riesgo cardiovascular, diabetes mellitus, macrosomía fetal, muerte neonatal, parto prematuro y alteraciones en patrones de crecimiento.	Tenenbaum et. al. 2013

---

Defectos del tubo neural, incluida la espina bífida; Stothard et. al, 2009  
anomalía cardiovascular, incluida una anomalía del  
tabique ventricular; paladar hendido, atresia anorrectal;  
hidrocefalia, labio leporino y anomalías de reducción de  
extremidades

---

Obesidad infantil, defectos del tubo neural, muerte fetal Castro et. al, 2002  
y parto prematuro

---

Se sabe que las madres gestantes que tienen sobrepeso, que consumen dietas altas en grasas o que sufren enfermedades metabólicas, presentan un riesgo para el desarrollo cerebral del niño (Martí, 2022). Una dieta inadecuada, pobre en nutrientes y rica en grasas y azúcares, puede generar alteraciones de la capacidad del niño para absorber correctamente los alimentos y, por lo tanto, generar problemas en el funcionamiento cerebral y afectaciones en varios sistemas del cuerpo.

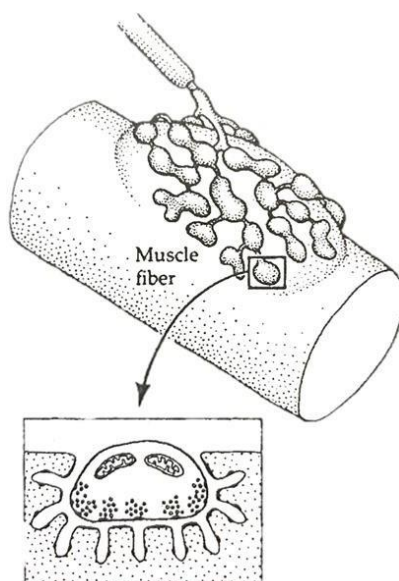
Una de las principales comorbilidades de la obesidad infantil son las afecciones del sistema neuromuscular, las cuales son al menos 26% más recurrentes en niños y adolescentes con sobrepeso u obesidad comparado con sujetos con normo-peso (Paulis, 2013) En particular, se han reportado disminuciones en la velocidad de conducción de los nervios motores y en la amplitud del potencial de acción en los nervios sensoriales. Estos déficits se acompañan de hiperalgesia y/o alodinia, entumecimiento, desequilibrio, debilidad distal y disminución de la masa muscular (Akin et al., 2016b; Baum et al., 2013; de Sá Pinto et al., 2006; Ince et al., 2015; Krul et al., 2009; Perea et al., 2009; Pillen et al., 2003; Ruíz et al., 2015; Stovitz et al., 2008; Tomlinson et al., 2016). Además, se presentan también síntomas disautonómicos que incluyen distensión gástrica, estreñimiento y enuresis (Erdem et al., 2006; Guven et al., 2007). También se ha encontrado, en niños que desarrollan obesidad en edades muy tempranas, aumentos de los depósitos de grasa intramuscular, circunstancia que compromete la integridad de los músculos y su

fuerza (Cruz Guzmán et al., 2012).

Considerando lo anterior, es probable que la sobreexposición nutricional pregestacional de la madre y la exposición gestacional excesiva a macronutrientes grasos disminuya el soporte trófico neuromuscular, conduciendo así a las disfunciones musculares que presentan los niños obesos.

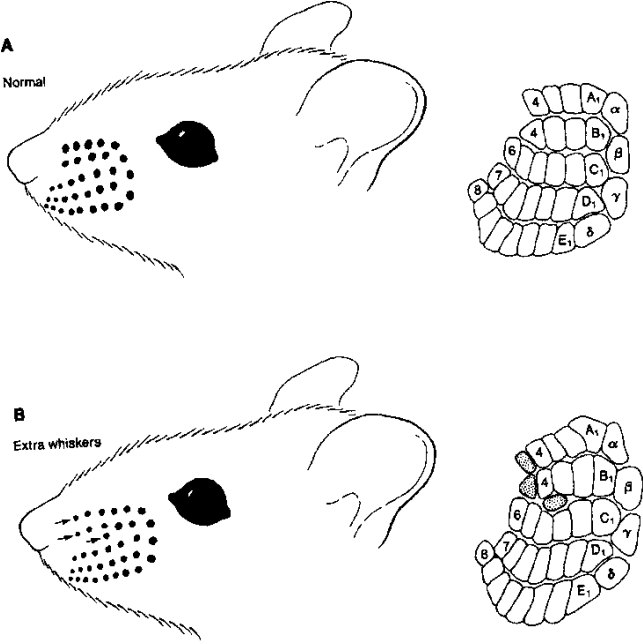
### **Teoría trófica de las conexiones neurales**

Durante la ontogenia, el cuerpo y el cerebro sostienen interacciones interdependientes denominadas tróficas que permiten ajustar de forma recíproca la morfología funcional de uno con respecto del otro (Purves, 1988). De acuerdo con ello, se sabe que el desarrollo de las fibras musculares es promovido por las sustancias liberadas desde los nervios motores (e.g., acetilcolina; Figura 1), y que la supervivencia de estas depende del aprovisionamiento de factores neurotróficos (e.g., factor de crecimiento neuronal) secretados por los músculos (Khan y Smith, 2015, Hong et al., 2014, Sinnatamby, 2003).



**Figura 1.** Ilustración que muestra las relaciones estrechas que se establecen entre las terminales del nervio motor somático y una fibra de músculo esquelético en la denominada unión neuromuscular. Las fibras nerviosas modelan al músculo en función de los patrones de liberación de acetil colina. En respuesta, las fibras musculares proveen a los nervios de factores proteicos que promueven la supervivencia neuronal (adaptado de Purves, 1988).

Un ejemplo muy claro de lo expresado anteriormente lo constituye la relación que existe entre la representación cortical de las vibrisas faciales y estos órganos sensoriales ubicados en el belfo de los ratones (Figura 2). En aquella, cada vibrisa facial está representada en la capa IV de la corteza por una unidad citoarquitectónica que se ha denominado barril. Modificaciones en el arreglo o número de las vibrisas alteran a su representación cortical de forma coincidente, ilustrando claramente la interdependencia cuerpo-cerebro.



**Figura 2.** Imagen representativa de las vibrisas faciales en la corteza somatosensorial de ratones. En (A) se muestra un ejemplo de ratón común en el que presenta cinco filas de vibrisas (cada vibrisa representada por un punto negro); en correspondencia a cada vibrisa se muestra un barril. Los números y letras de los barriles, corresponden a la nomenclatura convencional. En (B) se muestra un ejemplo de ratón que posee tres vibrisas adicionales (indicado con flechas) en comparación al ratón común (A). En correspondencia a cada vibrisa, en la representación somatosensorial, se muestran tres barriles extra, indicados en color gris. (Imagen adaptada de Purves, 1988).

La organización del cerebro en varios animales refleja la organización del cuerpo, esto implica un medio de comunicación entre el cuerpo y el sistema nervioso que es capaz de modular la organización neuronal de generación en generación. Este ejemplo indica que las diferencias en el tamaño y la forma de los animales, ya sea en la ontogenia o en la filogenia, van acompañadas de cambios proporcionales en el sistema nervioso que aseguran un control neural eficiente del cuerpo (Purves,

1988). En concreto, podemos establecer que el trofismo muscular es el proceso de desarrollo, nutrición y el mantenimiento de los músculos.

Con lo descrito anteriormente, no resulta difícil pensar que, cuando el feto es sometido a sobrecargas nutrimentales durante el desarrollo del músculo esquelético, la ontogenia de éste se tornaría susceptible a modificaciones tróficas (Du et al., 2010). En apoyo a esta posibilidad, Bayol y colaboradores (2005) examinaron los efectos de una dieta obesogénica sobre el desarrollo del músculo esquelético y el tejido adiposo en crías de ratas al momento del destete. Estos autores observaron que las ratas expuestas a este tipo de dieta durante la gestación y lactancia mostraron una reducción del 25 % en el área transversal del músculo semitendinoso a los 21 días de vida. Este músculo mostró 20 % menos fibras, y el doble de infiltración de tejido adiposo en comparación con las crías alimentadas con una dieta regular.

Dada la evidencia que se presenta sobre el deterioro a nivel estructural del músculo, sería probable suponer que el funcionamiento del mismo podría alterarse simultáneamente. Esto debido a que la unión neuromuscular es una estructura dinámica que experimenta cambios morfológicos y funcionales en respuesta a las demandas ambientales cambiantes, lo que refleja el vínculo esencial entre la neurona y la fibra muscular. Además, la capacidad oxidativa del músculo depende del tipo de fibras reclutadas por los mismos. Por lo tanto, la combinación funcional entre las propiedades de las neuronas y las fibras musculares constituye una característica clave del control neuromotor (Sieck G. & Prakash Y., 1997), el cual pudiera verse comprometido a falta de nutrientes durante esa etapa crítica del desarrollo.

Simultáneamente, el músculo esquelético es crucial para la regulación del metabolismo de la glucosa de todo el cuerpo. Los músculos contienen enzimas necesarias para la síntesis de glucógeno, la glucólisis y la oxidación de la glucosa. La regulación de enzimas metabólicas en el músculo esquelético ocurre como respuesta a cambios en la demanda de adenosín trifosfato (ATP), la disponibilidad de sustratos, y en respuesta a la estimulación hormonal y neural (Friedman, 2002).



Por esta razón, resulta conveniente evaluar prenatalmente, como elementos de la comunicación trófica entre el cuerpo y el cerebro, tanto la estructura del músculo, así como su funcionamiento.

## Justificación

La obesidad infantil se ha asociado a un estado de condicionamiento inducido por la sobre nutrición gestacional. El condicionamiento nutricional pregestacional de la madre y gestacional en el feto pudiese alterar las relaciones tróficas entre el cuerpo y el cerebro, situación que afectaría el crecimiento y funcionamiento del músculo esquelético prenatalmente, y que podría conducir a las anomalías musculares reportadas en niños obesos. La veracidad de los últimos supuestos mencionados, no ha sido evaluada hasta el momento. Dadas las implicaciones que estos pudieran tener, la justificación del presente estudio radica en la necesidad de verificarlos experimentalmente a fin de identificar el posible origen de las afecciones neuromusculares observadas en niños con obesidad.

## Objetivo general

Verificar, mediante una aproximación inferencial, si existe un condicionamiento nutricional gestacional fetal que afecte el desarrollo muscular estriado antes del nacimiento, a través de evaluar los efectos de la sobreexposición nutrimental pregestacional de la madre y gestacional en el feto a una dieta alta en grasas sobre el desarrollo neuromuscular en fetos de rata a término.

## Objetivos específicos

- Estimar y comparar el volumen de los músculos cuádriceps e isquiotibiales en las extremidades posteriores de los fetos cuyas madres fueron sobre nutridas o no con dietas altas en grasas, de forma previa y durante la gestación.
- Estimar y comparar los cambios in situ de la función oxidativa mitocondrial de los músculos cuádriceps e isquiotibiales en las extremidades posteriores de los fetos cuyas madres fueron sobre nutridas o no con dietas altas en grasas, de forma previa y durante la gestación.
- Estimar el tamaño de las placas neuromusculares de los músculos cuádriceps e isquiotibiales en las extremidades posteriores de los fetos cuyas madres fueron sobre nutridas o no con dietas altas en grasas, de forma previa y durante la gestación.

- Estimar la magnitud de la infiltración grasa de los músculos cuádriceps e isquiotibiales en las extremidades posteriores de los fetos cuyas madres fueron sobre nutridas o no con dietas altas en grasas, de forma previa y durante la gestación.

## Hipótesis

La sobreexposición nutrimental pregestacional de la madre y gestacional en el feto, condicionará las relaciones tróficas entre el cuerpo y el cerebro, situación que conducirá a hipotrofia muscular y una disminución de la función oxidativa en las crías hacia el término de la gestación.

## Materiales y Métodos

### *Animales y diseño experimental*

Se utilizaron 19 ratas hembra de la cepa Wistar de 21 días de edad provenientes de la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Todos los procedimientos experimentales se realizaron siguiendo las condiciones establecidas por la NOM-062-ZOO-1999 para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. Además, los protocolos aquí descritos fueron revisados y aprobados por el Comité para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la entidad (número de proyecto: 238).

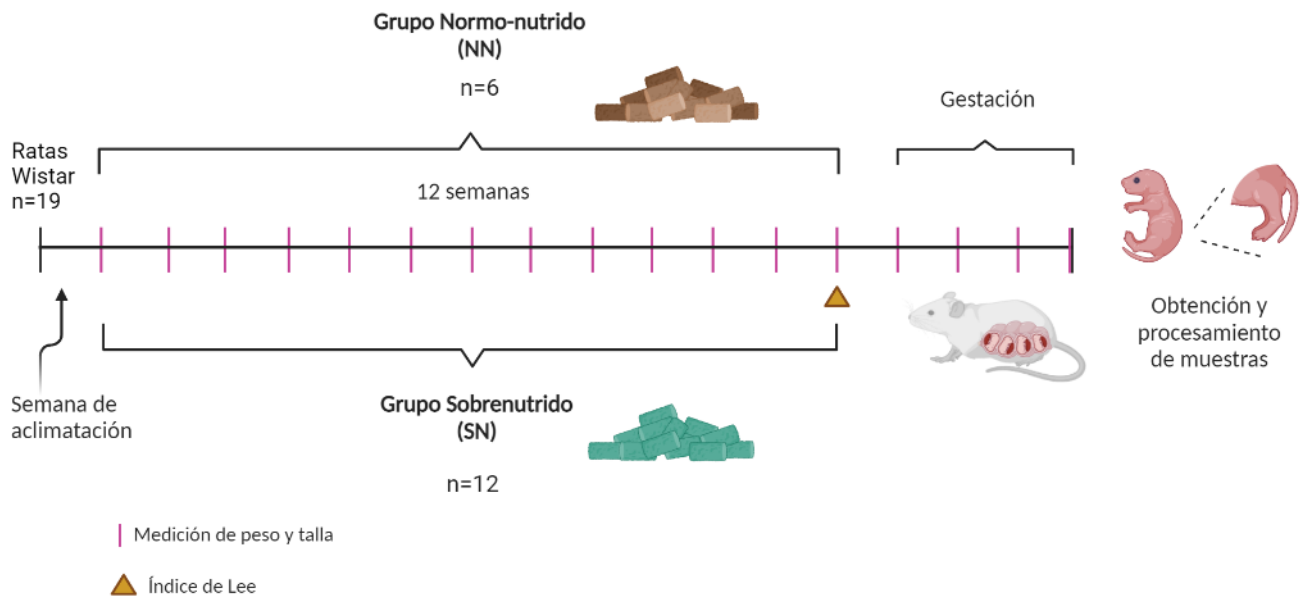
Los animales se mantuvieron a 21°C bajo ciclos de 12 horas de luz/oscuridad (encendido de luz 7:00 h), con acceso libre al agua y al alimento. Previo al inicio del experimento, las ratas se aclimataron a los cuartos de cobijo durante una semana. En este periodo el alimento que consumieron fue la dieta estándar (Teklad 18S, Anexo 1). Al inicio del periodo experimental, se registró el peso y la talla corporal. Transcurrido el periodo de aclimatación, las hembras se dividieron aleatoriamente en dos grupos no balanceados: normo-nutrido (NN; n=6) y sobre nutrido (SN; n=13). La distribución anómala de los grupos se debió a que la sobre nutrición grasa disminuye la eficacia reproductiva (Kannan & Bhaskaran, 2019). Durante el periodo de condicionamiento dietético, el grupo NN fue alimentado con la dieta estándar

(Envigo, TD18S; Anexo 1) mientras que el grupo SN consumió una dieta alta en grasas (Envigo, TD 06414; Anexo 2). En la dieta alta en grasas, el 60% de las calorías totales provienen de las grasas, mientras que en la dieta estándar el 18% de calorías totales son provenientes de grasas. Es decir, cada 100 g de alimento alto en grasas contiene 510 kcal de las cuales 306 kcal son provenientes de las grasas, en comparación con la dieta estándar que, por cada 100 g de alimento contiene 300 kcal de las cuales 54 kcal son provenientes de las grasas. Esta alimentación persistió durante 12 semanas, tiempo en el que se registraron semanalmente el peso y la talla corporal, así como la ingesta total en ambos grupos.

A fin de documentar el condicionamiento causado por la dieta alta en grasas sobre el cuerpo de la futura madre, durante la última semana de tratamiento, se estimaron el índice de Lee (equivalente al índice de masa corporal; (Suárez Román et al., 2013), el cual resulta de dividir la raíz cúbica del peso corporal (g) entre la longitud naso-anal (cm), multiplicado por 1000. Para el estudio, solo se incluyeron aquellas hembras SN que mostraron un índice de Lee igual o mayor a 310 ( $335.2^* \pm 10.73$ , en total se descartó 1 de 13). Por otro lado, los valores del índice de Lee para todas las hembras NN se registraron por debajo de 310 ( $297.0 \pm 4.468$ ).

### ***Periodo de gestación***

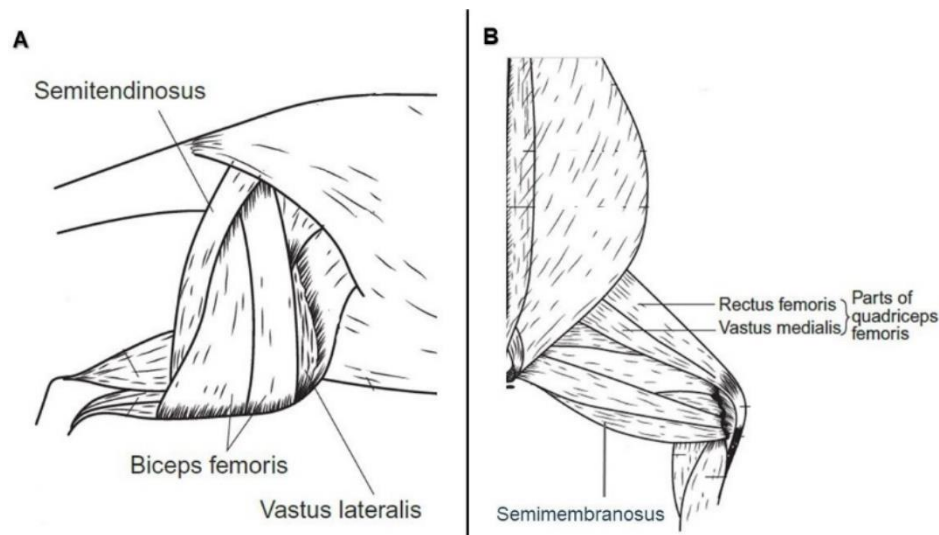
Para realizar las cruzas correspondientes, se utilizaron 10 ratas macho de la cepa Wistar de 16 semanas de edad. Las cruzas se asignaron de manera aleatoria, cuando las hembras NN y SN se encontraban en las fases receptivas. Los encuentros copulatorios se mantuvieron por una noche (Marcondes et al., 2002). El éxito en la gestación fue corroborado mediante citologías vaginales postcoitales y monitoreando, en los días subsecuentes a la cópula, la ganancia de peso en las hembras. En los casos de las hembras que no fueron gestadas durante el primer encuentro copulatorio, estas se colocaron en cruce hasta por dos veces más. Los animales que alcanzaron el límite de cruces sin conseguir la gestación, se excluyeron del estudio. Así mismo, es importante señalar que, durante la gestación, todas las hembras consumieron la dieta correspondiente del grupo al que fueron asignadas.



**Figura 3.** Diseño experimental. Inducción al modelo de obesidad con una dieta alta en grasas. Medición de peso y talla cada semana e índice de Lee después de 12 semanas. Se realizaron las cruza correspondientes y los fetos se extrajeron a los 20 días de gestación para su posterior procesamiento. Figura realizada en biorender.com

### Obtención y procesamiento de las muestras

Las muestras musculares fueron obtenidas de fetos extraídos por cesárea a los 20 días de gestación, un día antes de la fecha estimada de parto. Para ello, las madres gestantes NN y SN fueron sacrificadas con una sobredosis de pentobarbital sódico suministrada por vía intraperitoneal (120 a 210 mg/kg). A fin de evaluar los posibles cambios en la ontogenia muscular, una vez extraídos y decapitados uno a uno los fetos (Figura 4; Maynard Robert Lewis & Downes Noel, 2019), las extremidades posteriores fueron desarticuladas de la cadera y fijadas por inmersión en una solución de paraformaldehído 4% (PFA) amortiguado (diluido en tampón de fosfatos-salina 0.1M, pH 7.4) durante 48 horas a 4 °C.



**Figura 4.** Imagen representativa de los músculos que conforman (A) al músculo isquiotibial (semitendinoso, bíceps femoral y semimembranoso) y (B) al cuádriceps (recto femoral, vasto lateral y el vasto medial) (Imagen adaptada de Maynard Robert Lewis & Downes Noel, 2019).

Una vez fijadas, las extremidades posteriores se lavaron con PBS, y se crioprotegieron mediante la inmersión consecutiva de ellas a lo largo de un gradiente de sacarosa (10, 20 y 30%) durante 24h a 4°C en cada disolución. Finalmente, los tejidos fueron almacenados en sacarosa al 30%, adicionada con 0.1% de azida de sodio a 4°C, hasta su uso. El día del procesamiento, las extremidades se incluyeron en el medio de montaje OCT, y se cortaron sagitalmente a 40µm en un criostato a -25 °C. Los primeros cinco cortes se desecharon, y se montaron los siguientes 18 cortes consecutivos en portaobjetos gelatinizados. Las laminillas se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

## **Identificación de características histológicas**

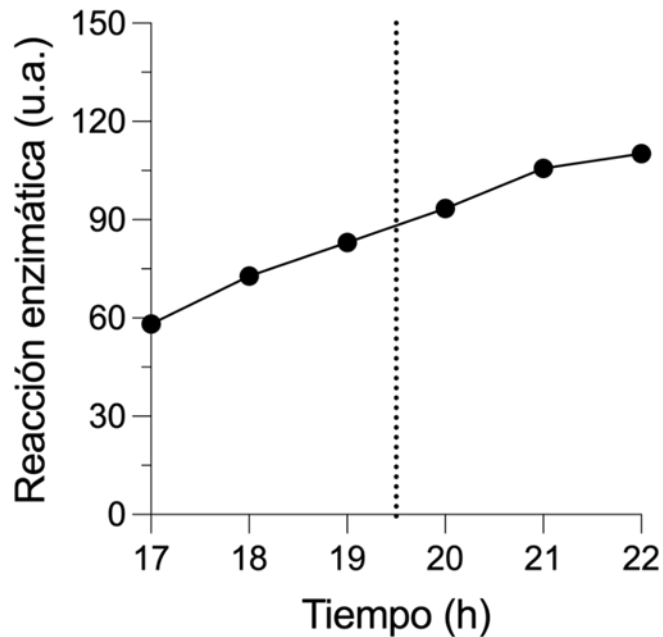
### **a) Tinción de hematoxilina y eosina (H-E)**

Los cortes obtenidos se tiñeron con H-E para estimar el volumen muscular total de las extremidades derechas (n=10 por grupo). Para ello, los cortes se lavaron e hidrataron. Posteriormente, se sumergieron durante 30 segundos en hematoxilina de Harris, inmediatamente después los cortes se lavaron con agua para luego ser transferidos a una solución de carbonato de litio ( $\text{Li}_2\text{CO}_3$  al 1%). Una vez contrastados, los cortes se sumergieron en eosina por 10 segundos, y se realizó un último lavado con agua corriente para retirar el exceso del colorante. Seguido de ello, los cortes se deshidrataron en un gradiente de etanol al 50, 70, 96 y 100%. Por último, los cortes se aclararon con xileno y se montaron con resina sintética, Cytoseal 60 (Richard-Allan Scientific), para su posterior observación en el microscopio.

### **b) Reacción de citocromo oxidasa**

Para evaluar la función mitocondrial de los músculos cuádriceps e isquiotibiales de las extremidades izquierdas de cada feto, estimamos el nivel de actividad de la enzima citocromo oxidasa por densitometría (n=10 por grupo). Para ello, los cortes obtenidos se incubaron en la solución de trabajo (cada 6mL de solución de trabajo contienen 3mg de diaminobencidina (DAB, D5637; Sigma), 1.8mg de citocromo (CytC, C7752; Sigma) 1.2 mg de catalasa (C9322; Sigma), 240 mg de sacarosa y 5.5 ml de en PBS 0.1 M) durante 19:30h a 37°C; el tiempo de incubación se estimó en función de una

curva de cinética enzimática (Figura 5). La reacción se detuvo a la mitad del tiempo que tarda la tinción en alcanzar su intensidad máxima. Transcurrido el tiempo mencionado, la reacción se detuvo mediante 3 lavados con PBS. Los cortes se dejaron secar a temperatura ambiente, se aclararon con xilol, se montaron con resina sintética Cytoseal 60 (Richard-Allan Scientific) para su posterior observación.



**Figura 5.** Gráfico de puntos que ilustra la cinética de reacción de la enzima citocromo oxidasa estimada con base en la actividad relativa de la enzima en cortes histológicos fijados de la extremidad inferior completa. La línea punteada corresponde al punto medio entre el inicio de la reacción y la asintota de saturación de la reacción. La curva fue elaborada utilizando 4 cortes por punto provenientes de una misma extremidad obtenidas de un feto de la condición nutricional NN.

### c) Acetilcolinesterasa

Para determinar el tamaño de los elementos presinápticos de las placas motoras y estimar los niveles de actividad de la enzima acetilcolinesterasa, se obtuvieron cortes de las extremidades izquierdas (n=5 por grupo) que fueron incubados durante una noche (18 horas) a temperatura ambiente, protegidos de la luz, en la solución de trabajo (116 mg de acetilcolina yodada, 3 mg de etopropazina disueltas en 100 ml de solución de base; cada 500 ml contienen 3.4 g de acetato de sodio, 0.5 g de cristales de sulfato de cobre, 0.6 g de glicina en agua bidestilada; pH 5.0). Posteriormente, el producto de reacción se reveló incubando los cortes a sulfuro de amonio al 0.1% durante 1 minuto a temperatura ambiente. Los cortes se dejaron

secar a temperatura ambiente, se aclararon con xilol y se montaron con resina sintética, Cytoseal 60 (Richard-Allan Scientific) para su posterior observación.

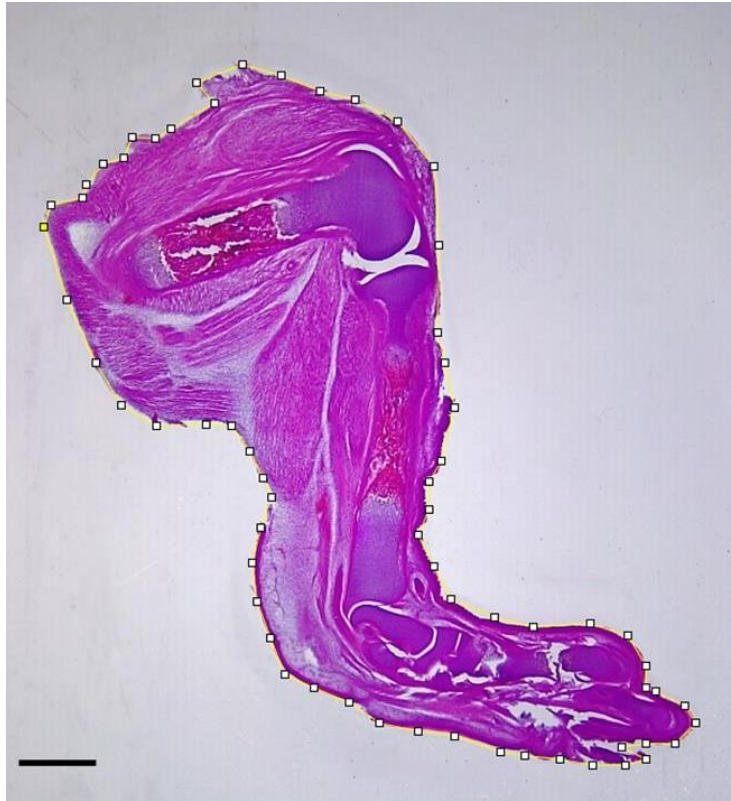
#### **d) Tinción de rojo oleoso**

A fin de estimar la magnitud de la infiltración lipídica en los músculos cuádriceps e isquiotibial, se realizó la tinción histoquímica con rojo oleoso en los cortes de las extremidades derechas de cada feto en ambos grupos experimentales (n=5 por grupo). Para ello, los cortes se sumergieron en propilenglicol al 100% durante 5 minutos a temperatura ambiente, luego se pasaron al colorante rojo oleoso a 60°C durante 5 minutos, seguido de propilenglicol al 80% durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, los cortes se lavaron con agua destilada y se montaron con el medio acuoso VectaMount AQ para su observación.

#### ***Análisis de imágenes***

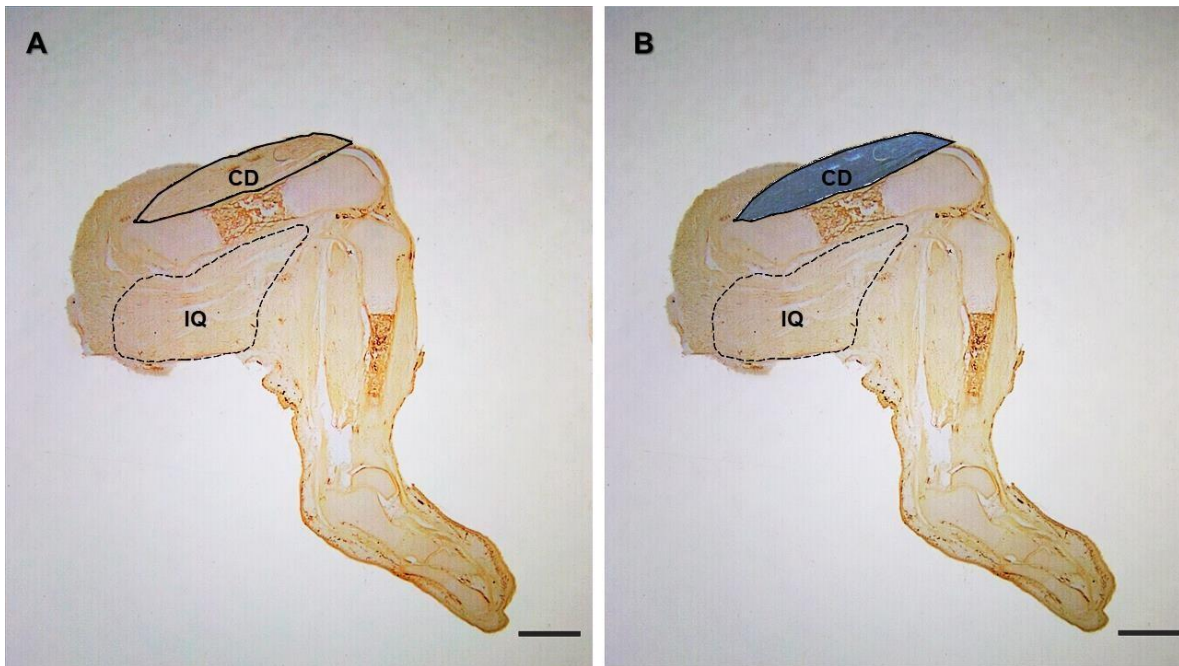
Los cortes teñidos con H-E fueron fotomicroografiados digitalmente (1600 x 1200 píxeles) utilizando el microscopio Leica EZ4E (8X). Se reunieron un total de entre 20 y 30 imágenes por cada extremidad evaluada. En cada imagen se delineó el contorno muscular con el fin de estimar el área ocupada por los músculos cuádriceps e isquiotibiales (Fig. 6), con apoyo del programa Image J (NIH, USA). La multiplicación del área obtenida por el grosor (40µm) del corte nos permitió obtener el volumen muscular por cada sección. El volumen muscular total integrado por extremidad fue obtenido al sumar los valores del volumen calculados para cada corte consecutivo en la extremidad estudiada. El promedio del volumen muscular por grupo se obtuvo sumando el volumen muscular total integrado de cada extremidad perteneciente al grupo analizado, dividido entre el número de extremidades consideradas en el estudio para cada grupo.





**Figura 6.** Fotomicrografía digital representativa de una extremidad posterior de una rata NN que ilustra la delimitación de la extremidad completa utilizada para estimar su área. Una vez calculada esta, el volumen total en la rebanada se obtuvo al multiplicar el valor del área obtenida por el grosor ( $40\ \mu\text{m}$ ) del corte. Escala=  $500\ \mu\text{m}$ .

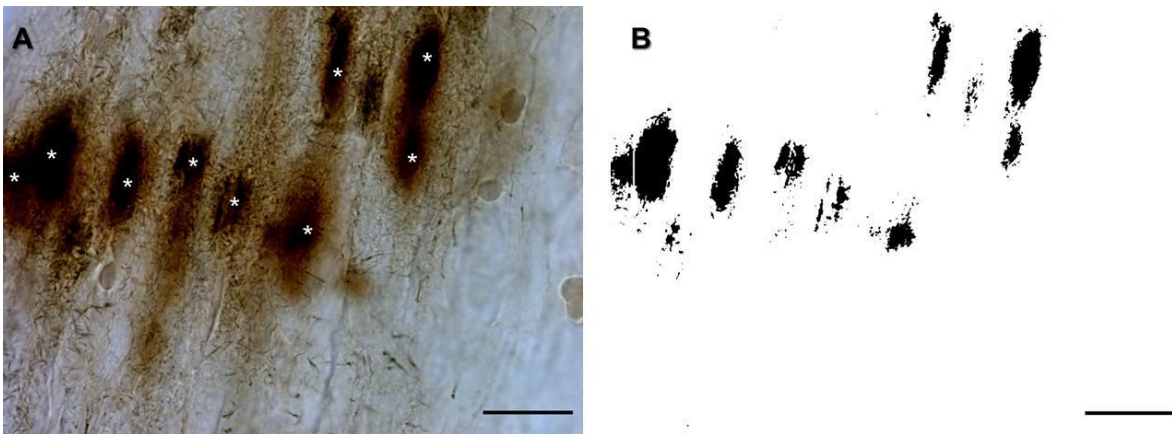
Las muestras histoquímicamente teñidas para citocromo oxidasa, se fotomicrografiaron ( $1600 \times 1200$  píxeles) utilizando el microscopio Leica EZ4E (8X). Se reunieron un total de entre 12 y 18 imágenes por cada extremidad evaluada. En cada imagen se delineó el contorno muscular y se impuso una máscara sobre el interior del contorno para estimar la densidad relativa de tinción en los músculos cuádriceps e isquiotibiales (Fig. 7), con apoyo del programa Image J (NIH, USA). La densidad relativa de tinción integrada obtenida para cada músculo por extremidad se estimó sumando los valores obtenidos en cortes consecutivos hasta completar la extremidad. La densidad de tinción promedio por grupo se obtuvo sumando la densidad relativa de tinción integrada de cada extremidad perteneciente al grupo estudiado, dividido entre el número de extremidades consideradas en el estudio para cada grupo.



**Figura 7.** A. Fotomicrografía digital representativa de una extremidad posterior de rata SN que ilustra la delimitación de los fascículos que constituyen a los músculos cuádriceps (CD; línea continua) e isquiotibiales (IQ; línea punteada). B. Fotomicrografía digital representativa de una extremidad posterior que ilustra la máscara digital impuesta sobre los fascículos musculares que constituyen al cuádriceps (área en azul), bajo la cual se obtuvo la densidad relativa de tinción de la enzima citocromo oxidasa. Una vez calculada esta, la densidad de tinción integrada de cada músculo por extremidad se obtuvo sumando los valores obtenidos y dividiendo el mismo entre el número de cortes analizados. Escala=500  $\mu$ m.

Para estimar el tamaño de las placas neuromusculares y la intensidad relativa de la marca histoquímica para la enzima acetilcolinesterasa en las fibras de los fascículos de los músculos cuádriceps e isquiotibiales, se fotomicrografiaron (100X) elementos presinápticos marcados con el apoyo de un microscopio OLYMPUS BX51WI acoplado a una unidad de disco giratorio (DSU), utilizando una interfaz generada con el software StereoInvestigator® (MBF Bioscience and Neuron Reconstruction, Williston, USA). Se produjeron lienzos de imágenes mediante un muestreo aleatorio simple de los músculos cuádriceps e isquiotibiales utilizando el módulo Optical Fractionator Workflow. Un total de 10 imágenes (1600 x 1200 píxeles) por músculo por corte fueron adquiridas digitalmente. El análisis posterior de las imágenes se llevó a cabo con ayuda del programa Image J (NIH, USA). Para estimar el tamaño de las placas se tomaron aleatoriamente las imágenes de 100 placas neuromusculares de los músculos cuádriceps e isquiotibiales (provenientes de 5 fetos de cada grupo

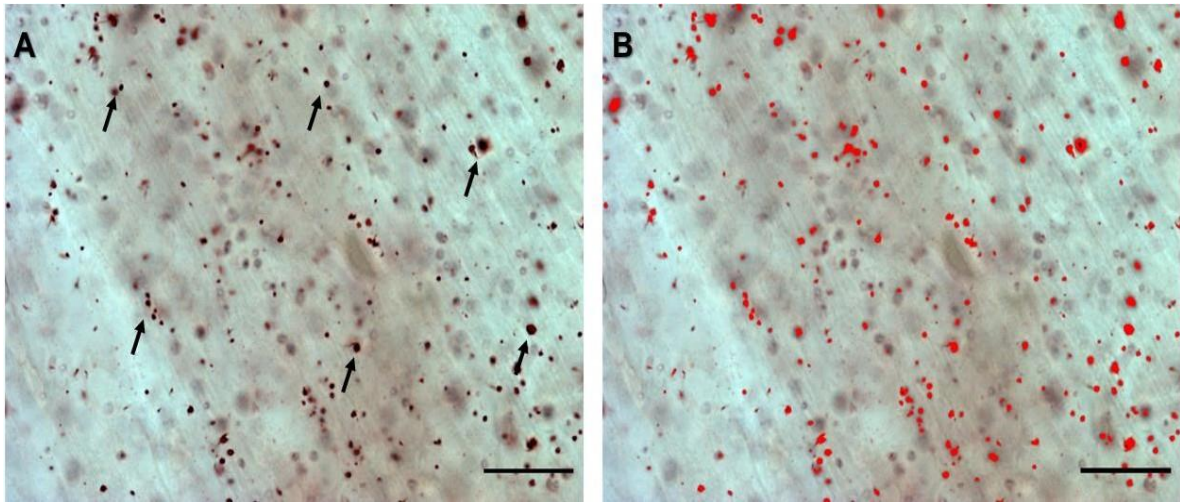
experimental). Las imágenes fueron segmentadas manualmente procurando abarcar la máxima área de tinción para cada placa (Fig. 8A). Una vez hecho esto, las imágenes fueron “binarizadas” (8-bits). Se estimaron tanto el área como la intensidad de la marca histoquímica bajo la máscara creada (Fig. 8B). Las placas que se consideraron en el análisis para ambos grupos experimentales tuvieron una superficie estimada en el rango de 30-50  $\mu\text{m}^2$  y un índice de circularidad de 0.01-0.99.



**Figura 8.** A. Fotomicrografía digital representativa de placas neuromusculares (asteriscos en blanco) teñidas histoquímicamente para la enzima acetilcolinesterasa en el músculo cuádriceps de la extremidad posterior de un feto NN. B. Fotomicrografía digital que muestra el resultado final obtenido después del proceso de segmentación y binarización de la imagen. Las máscaras creadas fueron utilizadas para estimar el tamaño en micrómetros cuadrados de la terminal nerviosa motora, y la intensidad relativa de la tinción para la enzima acetilcolinesterasa. Una vez calculadas ambas, el área y la densidad de tinción promedios fueron estimados por animal y por grupo. Escala= 20  $\mu\text{m}$ .

Los depósitos anormales de grasa en el músculo acompañan frecuentemente a la sobre alimentación grasa. Para evaluar si el exceso de grasa en la dieta materna durante la gestación condiciona la acumulación de grasa en los músculos fetales, en este trabajo fotomicrografiamos cortes de los músculos cuádriceps e isquiotibiales histoquímicamente teñidos con el colorante rojo oleoso, siguiendo el protocolo de adquisición de imágenes descrito en la sección precedente. Para estimar el número y tamaño de las vacuolas lipídicas se tomaron aleatoriamente 10 imágenes de los músculos cuádriceps (n=12 SN, n=18 NN) e isquiotibiales (n=12 SN, n=18 NN) pertenecientes a 5 de fetos cada grupo experimental. Las imágenes fueron segmentadas manualmente procurando abarcar la máxima área de tinción para cada vacuola (Fig. 9A). Una vez hecho esto, las imágenes fueron binarizadas

(8-bits), para crear una máscara que sirvió como plantilla de conteo y estimación del tamaño de las vacuolas lipídicas (Fig. 9B). Las vacuolas que se consideraron en el análisis para ambos grupos experimentales tuvieron una superficie estimada en el rango de 0.3-8.0  $\mu\text{m}^2$  y un índice de circularidad de 0.01-0.99.



**Figura 9.** A. Fotomicrografía digital representativa de vacuolas lipídicas (flechas) teñidas histoquímicamente con rojo oleoso en el músculo cuádriceps de la extremidad posterior de un feto NN. B. Fotomicrografía digital que muestra el resultado final obtenido después del proceso de segmentación y binarización de la imagen. Las máscaras creadas fueron utilizadas para estimar el número y tamaño en micrómetros cuadrados de las vacuolas. Una vez calculadas ambas, el número y el tamaño vacuolares promedios fueron estimados por animal y por grupo. Escala= 20  $\mu\text{m}$ .

## **Análisis estadístico**

Los datos obtenidos para cada parámetro considerado se registraron en una base producida en el programa Excel (Office 2019 Microsoft). Las diferencias intergrupales para las variables cuantitativas continuas (área y volumen de las masas musculares de los cuádriceps e isquiotibiales, intensidad relativa de la tinción histoquímica para la enzima citocromo oxidasa, número y tamaño de las placas neuromusculares y de las vacuolas lipídicas) se evaluaron mediante pruebas de comparación de medias. Para cada grupo de datos se evaluaron los supuestos: 1) Los datos provienen de una muestra aleatoria, 2) Las frecuencias esperadas para cada categoría son de al menos 1 y 3) No más del 20 % de las categorías tienden a tener frecuencias esperadas inferiores a 5. En cuanto a las pruebas que cumplieron con los supuestos, se formularon las hipótesis nula y alterna, y se determinó la distribución del estadístico de prueba, se formuló la regla de decisión, se calculó el estadístico de prueba y se tomó la decisión correspondiente en cuanto a rechazar o no la hipótesis nula. Con respecto a las variables cuantitativas continuas, también se evaluaron los supuestos: 1) muestra aleatoria, 2) normalidad y 3) homocedasticidad. Se encontró que el primer supuesto se cumplió en todos los casos, sin embargo, las variables no presentaron normalidad y/o homocedasticidad, supuestos que fueron evaluados con las pruebas de Shaphiro-Wilk y el test de Levene, respectivamente. En función de dichos resultados, se utilizó la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney, en la cual se cumplieron los supuestos, se formularon las hipótesis correspondientes, se determinó la distribución del estadístico de prueba, se formuló la regla de decisión, se calculó el estadístico de prueba y se tomó la decisión correspondiente en cuanto a rechazar o no la hipótesis nula. En todos los casos, se consideró un 95% de confianza y un  $\alpha < 0.05$ . Todos los análisis mencionados, así como la totalidad de las gráficas mostradas, se realizaron en el programa estadístico Prism 9.4.1 (GraphPad, Software Inc., USA). En todos los casos, los valores graficados se presentan como la mediana  $\pm$  el rango intercuartil.

## Resultados

### *Somatometría, eficiencia gestacional y eficacia reproductiva*

Para evaluar los efectos de la dieta alta en grasas sobre el desarrollo fetal, era necesario mostrar que dicha dieta en verdad modifica índices morfofuncionales de las madres previo a la gestación y durante la misma. En concordancia, durante el periodo de acondicionamiento dietético (12 semanas), las hembras alimentadas con la dieta alta en grasas (SN) presentaron incrementos significativos de peso, talla e índice de Lee >310, en comparación con a ratas alimentadas con la dieta estándar (NN) (Cuadro 2). Esta situación se tradujo, como grupo, en una caída del 41.6% de sus posibilidades de quedar gestantes. No obstante, ello, las hembras SN gestadas incrementaron su promedio de crías por camada al ser comparadas con las hembras gestantes NN (Cuadro 2).

#### **Cuadro 2**

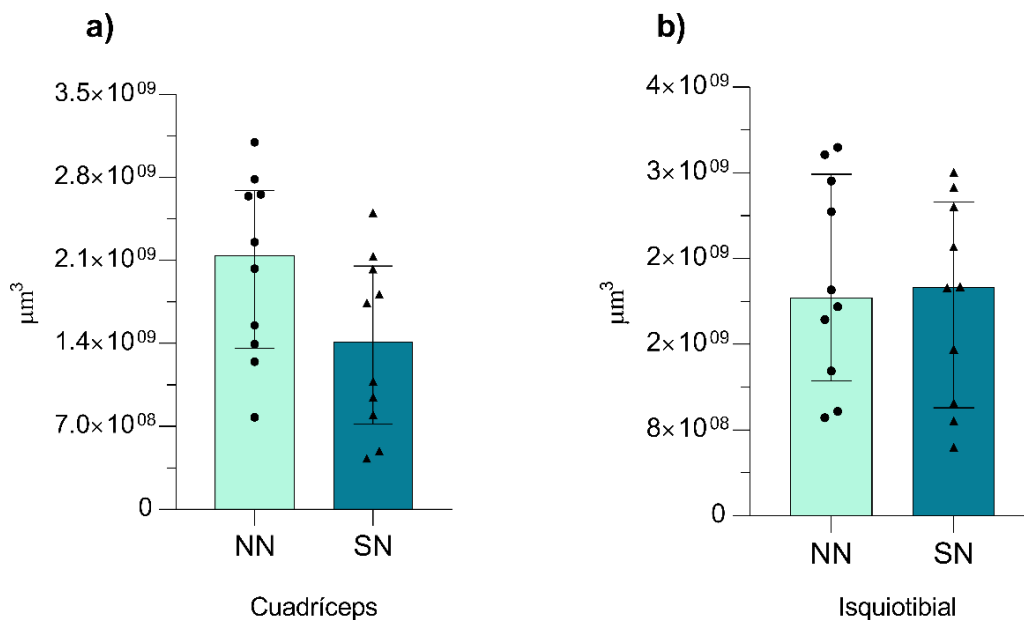
*Parámetros somatométricos e índices gestacionales y reproductivos en las hembras expuestas a dietas estándar (NN) y alta en grasas (SN).*

	n	Peso inicial	Peso final	Talla inicial	Talla final	Índice de Lee	Porcentaje de gestación	Número de crías	Promedio de crías
<b>NN</b>	6	87.00 ±	259.5 ±	10.92 ±	15.67 ±	297.0 ±	83.3%	53	11
		24.44	13.77	0.491	0.516	4.468			
<b>SN</b>	12	84.83 ±	388.3 * ±	10.88 ±	19.50 * ±	335.2* ±	41.6%	70	14
		5.306	44.95	0.678	1.446	10.73			

*Nota: Datos representados como media ± D.S. El análisis estadístico corresponde a una U de Mann Whitney, considerando una p < 0.05 como significativa. \* indica diferencias significativas.*

## Volumen muscular

Uno de los elementos anatómicos indicativos de la salud de las relaciones tróficas neuromusculares es la masa muscular. La hipotrofia de los músculos se relaciona con la caída del trofismo provisto, en buena medida, por la inervación. Nuestros resultados indican que el volumen del músculo cuádriceps tiende a reducirse en los fetos obtenidos de las madres SN al compararse con aquellos obtenidos de las madres NN.

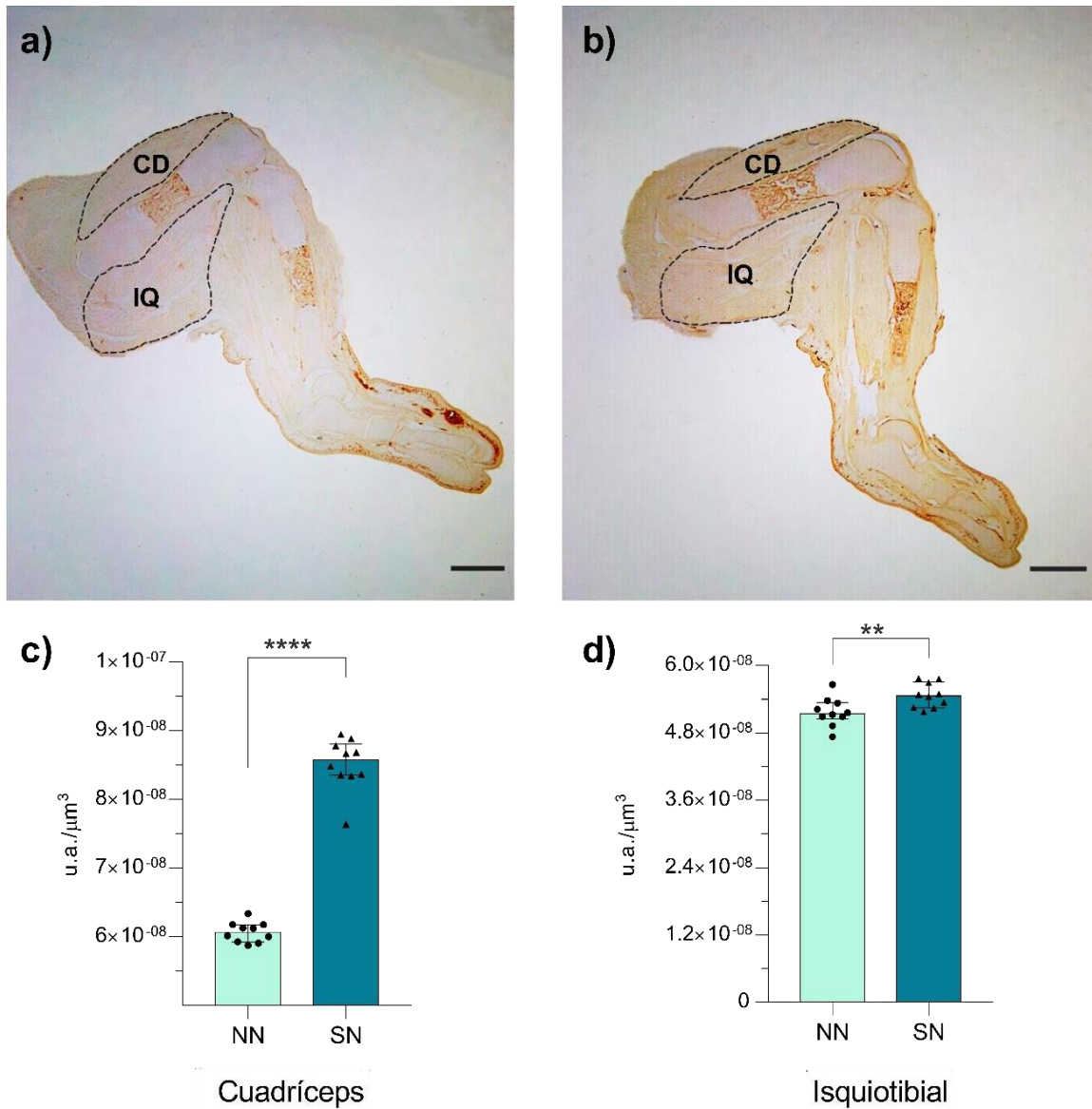


**Figura 10.** Volumen muscular. Gráficas del volumen muscular del a) cuádriceps e b) isquiotibial. Comparación en el volumen ( $\mu\text{m}^3$ ) para ambos grupos. Se presentan gráficas de barras con la mediana y el rango intercuartil. El análisis estadístico corresponde a una U de Mann Whitney a)  $U=26$ ,  $p=0.0753$ ,  $n=10$ , b)  $U=50$ ,  $p=0.9999$ ,  $n=10$ , considerando una  $p<0.05$  como significativa.

## Metabolismo oxidativo muscular

Estudios previos sugieren que la musculatura estriada en niños obesos se observa debilitada. En parte, esto pudiera deberse a la incorrecta generación de energía por las mitocondrias afectadas por las dietas excedidas en grasas (Langley et al., 2020). Por ello, evaluamos la capacidad oxidativa de los músculos cuádriceps e isquiotibiales en los fetos obtenidos de hembras gestantes NN y SN. Los resultados muestran que ambos músculos poseen una actividad mitocondrial oxidativa ligera,

pero significativamente aumentada, en los fetos obtenidos de madres SN (Figura 11).

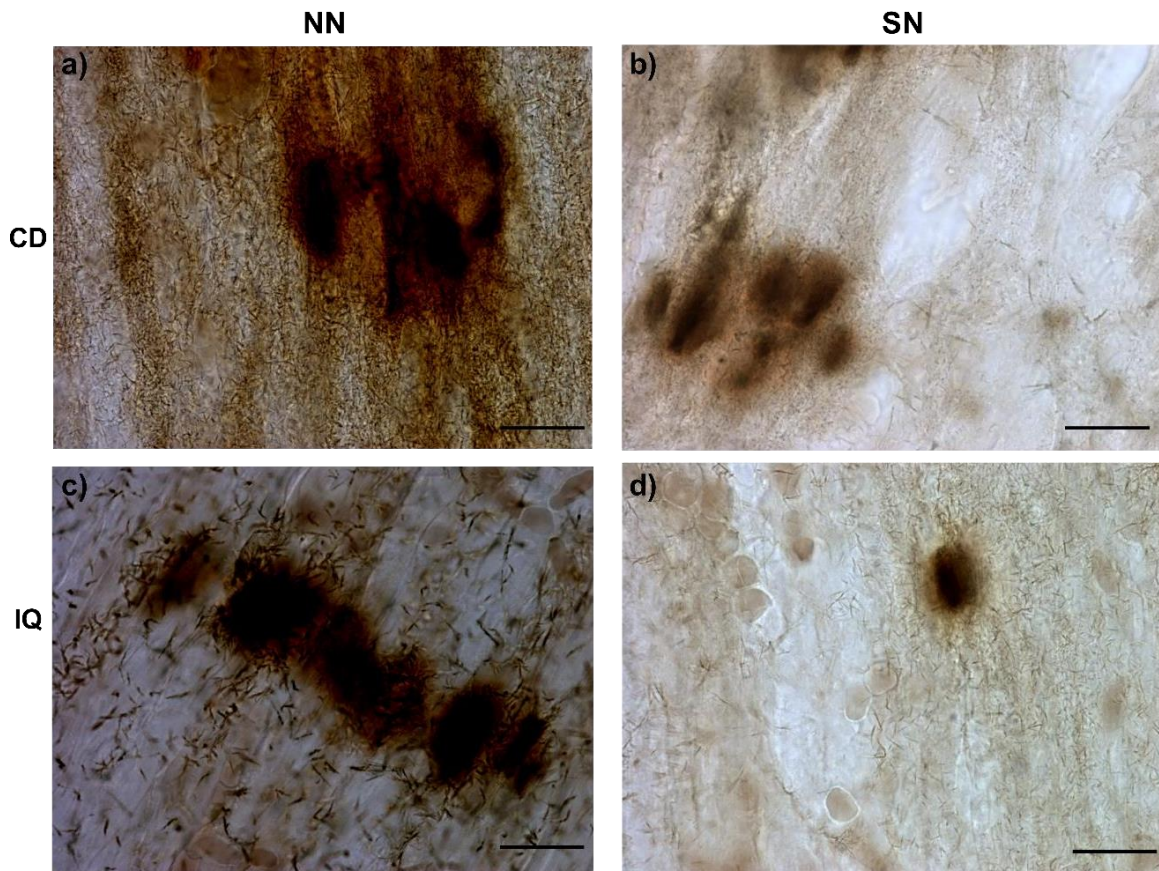


**Figura 11.** Fotografías representativas de la actividad mitocondrial del músculo cuádriceps (CD) e isiotibial (IQ) en animales NN a) y SN b). Gráficas de la actividad mitocondrial del músculo c) cuádriceps e d) isiotibial. Comparación en unidades arbitrarias entre el volumen (μm³) en ambos grupos. Se presentan gráficas de barras con la mediana y el rango intercuartil. El análisis estadístico corresponde a una U de Mann Whitney c)  $U=0$ ,  $p=0.0001$ ,  $n=10$ ,  $gl=9$ , d)  $U=15$ ,  $p=0.0068$ ,  $n=10$ ,  $gl=9$ , considerando una  $p<0.05$  como significativa. \* indica diferencias significativas. La barra de escala en a) y b) representa 500 μm.



### ***Parámetros morfo-funcionales de la placa neuromuscular***

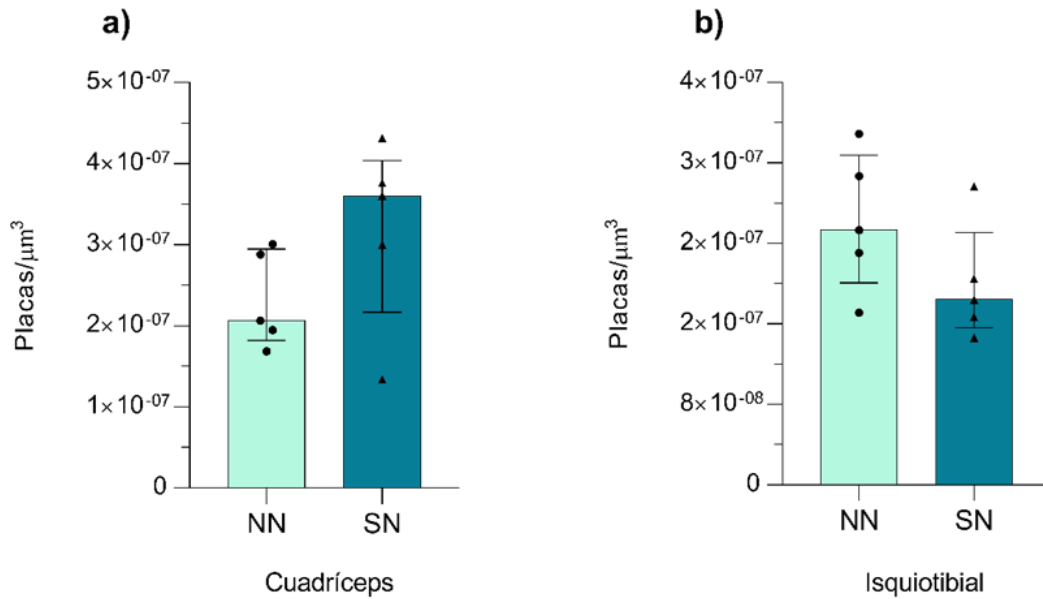
El tamaño y número de las placas neuromusculares son indicativos de madurez muscular. Con respecto al análisis de los elementos presinápticos, se observó una tendencia de menor cantidad de placas neuromusculares en el músculo isquiotibial (Figura 12, d) y un menor tamaño de las placas neuromusculares tanto en el músculo cuádriceps (Figura 12, b) como en el isquiotibial en el de los fetos obtenidos de madres SN.



**Figura 12.** Placas neuromusculares. Microfotografías representativas de la cantidad de placas neuromusculares en animales control en los músculos a) cuádriceps e c) isquiotibial y en animales SN en los músculos b) cuádriceps e d) isquiotibial. Nótese la presencia de proyecciones nerviosas de los animales NN en ambos músculos. La barra de escala en a), b,) c) y d) representa 20  $\mu$ m.

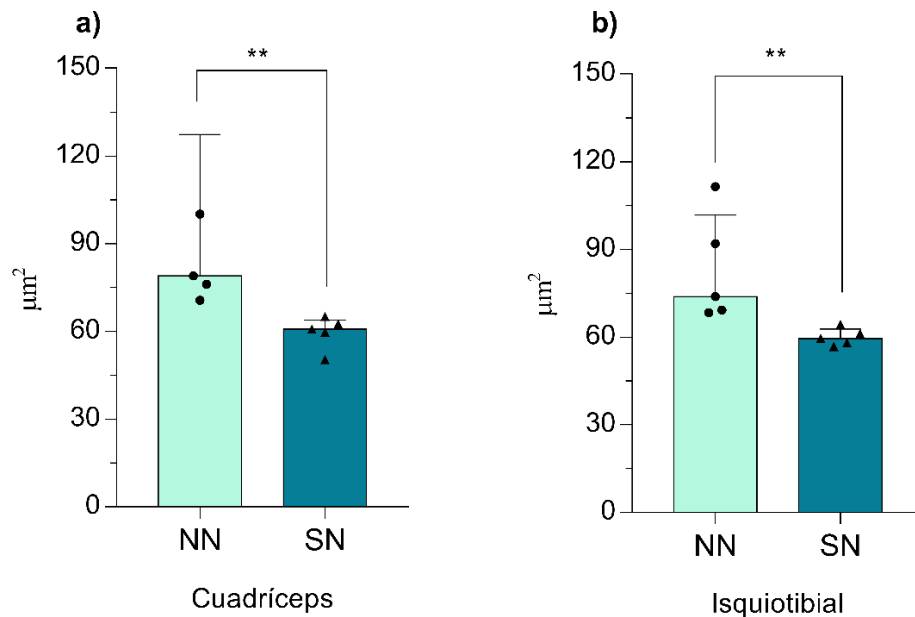
En cuanto a la relación entre la cantidad de placas neuromusculares y el volumen total de la extremidad inferior, las crías del grupo SN mostraron una tendencia al aumentar de la cantidad de placas neuromusculares en el músculo cuádriceps

(Figura 13, a). En contraste, el músculo isquiotibial presentó una tendencia a disminuir la cantidad de placas neuromusculares en comparación con el grupo NN (Figura 13, b).



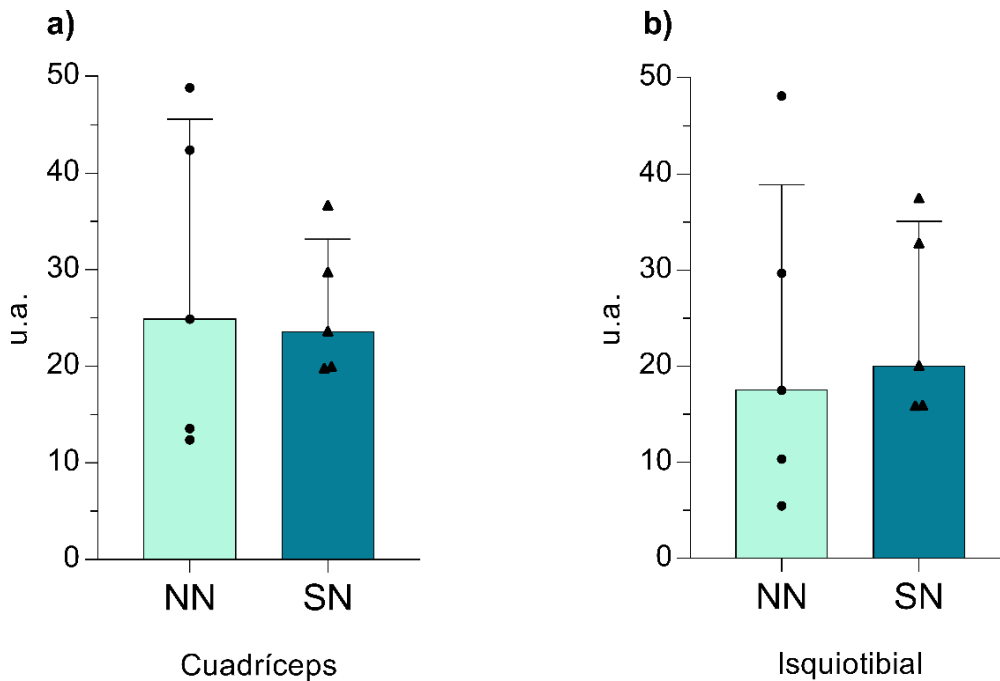
**Figura 13.** Cantidad de placas neuromusculares. Gráficas de la relación cantidad de placas neuromusculares entre el volumen total de la extremidad inferior, del músculo cuádriceps a) e isquiotibial b). Comparación en número de placas entre el volumen ( $\mu\text{m}^3$ ) en ambos grupos. Se presentan gráficas de barras con la mediana y el rango intercuartil. El análisis estadístico corresponde a una U de Mann Whitney a)  $U=6$ ,  $p=0.2222$ ,  $n=5$ ,  $gl=4$ , b)  $U=5$ ,  $p=0.1508$ ,  $n=5$ ,  $gl=4$ , se considera una  $p<0.05$  como significativa. \* indica diferencias significativas.

En relación con el tamaño de las placas neuromusculares, nuestros resultados muestran una disminución del tamaño de las placas neuromusculares en las crías obtenidas de las madres SN, tanto en el músculo cuádriceps (Figura 14, a) como en el isquiotibial (Figura 14, b).



**Figura 14.** Gráficas del tamaño de placas neuromusculares del músculo a) cuádriceps e b) isquiotibial. Comparación del área ( $\mu\text{m}^2$ ) para ambos grupos. Se presentan gráficas de barras con la mediana y el rango intercuartil. El análisis estadístico corresponde a una U de Mann Whitney a)  $U=0$ ,  $p= <0.0079$ ,  $n=5$ ,  $gl=4$ , b)  $U=0$ ,  $p= <0.0079$ ,  $n=5$ ,  $gl=4$ , se considera una  $p<0.05$  como significativa. \* indica diferencias significativas.

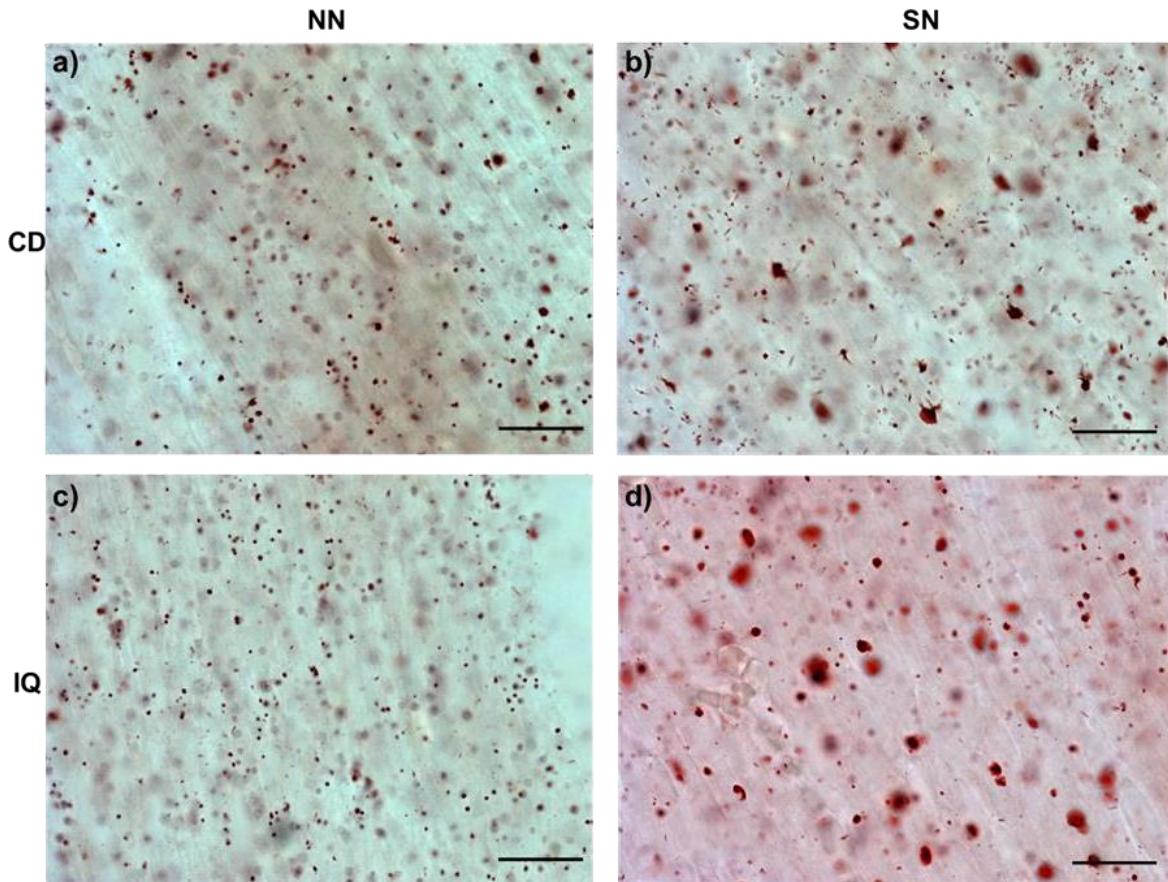
Aunado a lo anterior, en relación con la intensidad relativa de tinción para la enzima acetil colinesterasa de las placas neuromusculares, se mostró una tendencia de menor intensidad relativa de las placas neuromusculares en crías de madres SN en el músculo cuádriceps (Figura 15, a), en contraste con el músculo isquiotibial, el cual presentó una tendencia de mayor intensidad relativa en comparación con el grupo NN. (Figura 15, b).



**Figura 15.** Gráficas de la intensidad relativa de tinción para la enzima acetil colinesterasa de las placas neuromusculares del músculo a) cuádriceps e b) Isquiotibial. Comparación en unidades arbitrarias para ambos grupos. Se presentan gráficas de barras con la mediana y el rango intercuartil. El análisis estadístico corresponde a una U de Mann Whitney a)  $U=12$ ,  $p= >0.9999$ ,  $n=5$ ,  $gl=4$ , b)  $U=10$ ,  $p=0.6905$ ,  $n=5$ ,  $gl=4$ , se considera una  $p<0.05$  como significativa. \* indica diferencias significativas.

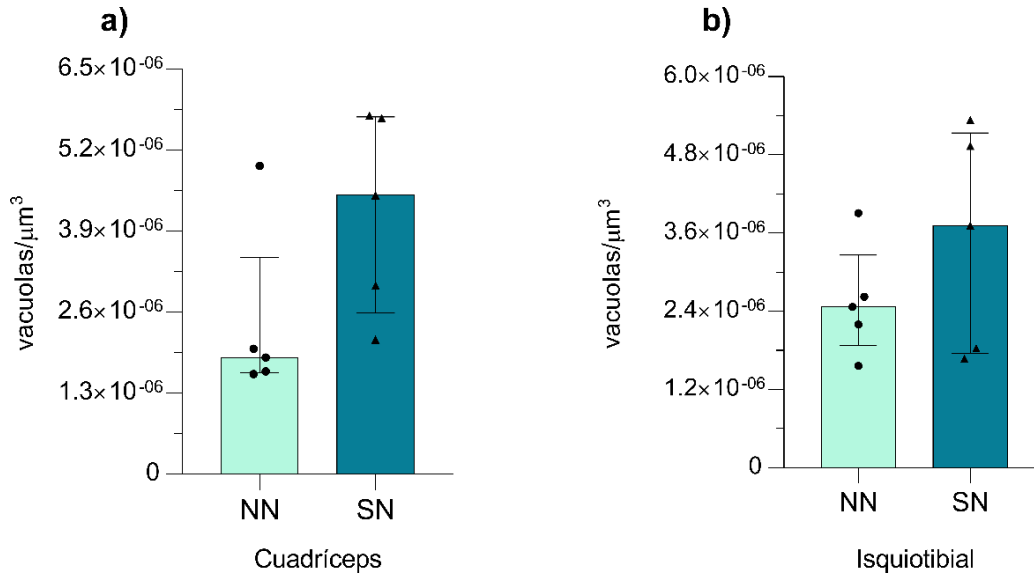
### ***Infiltración de vacuolas lipídicas***

La infiltración de grasa inter e intramuscular es un proceso degenerativo que se ha asociado a la disminución del grosor y la fuerza del músculo. Respecto a la infiltración de vacuolas lipídicas en los músculos, se observó un aumento de la cantidad y tamaño de vacuolas lipídicas en el músculo cuádriceps (Figura 16, b) e isquiotibial (Figura 16, d) de las crías de madres SN.



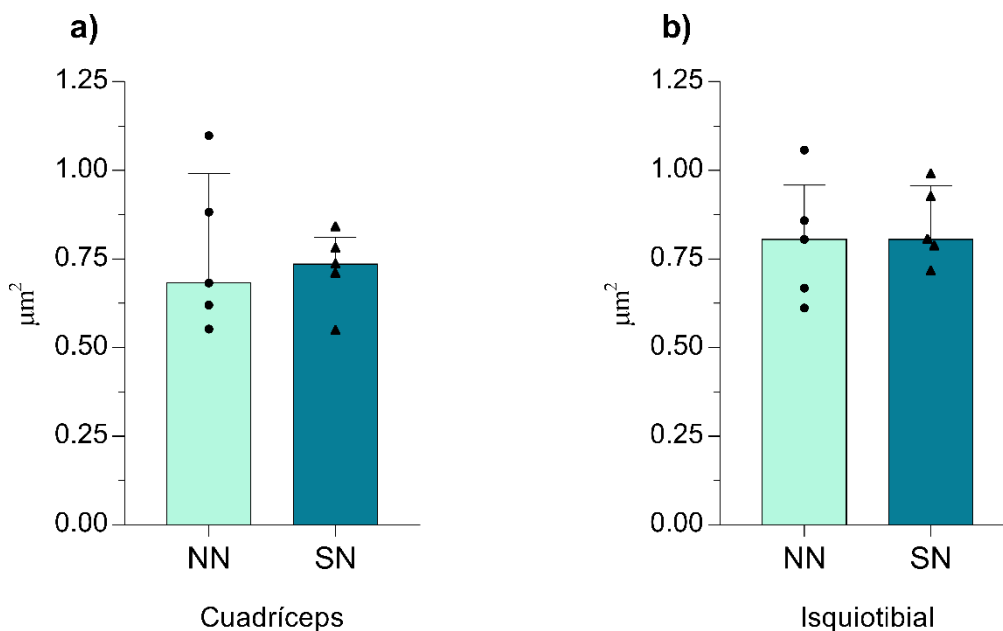
**Figura 16.** *Infiltración de vacuolas lipídicas. Microfotografías representativas de la cantidad y el tamaño de las vacuolas lipídicas en animales NN en los músculos a) cuádriceps e c) isquiotibial y en animales SN en los músculos b) cuádriceps e d) isquiotibial. La barra de escala en a), b), c) y d) representa 20  $\mu$ m.*

En cuanto a la relación entre la cantidad de vacuolas lipídicas y el volumen total de la extremidad inferior, las crías provenientes de madres SN muestran un aumento de vacuolas lipídicas en los músculos cuádriceps (Figura 17, a), e isquiotibial (Figura 17, b).



**Figura 17.** Gráficas de la relación cantidad de vacuolas lipídicas/volumen total de la extremidad inferior, del músculo a) cuádriceps e b) isquiotibial. Comparación en número de placas/volumen ( $\mu\text{m}^3$ ) en ambos grupos. Se presentan gráficas de barras con la mediana y el rango intercuartil. El análisis estadístico corresponde a una U de Mann Whitney a)  $U=3$ ,  $p=0.0556$ , d)  $U=9$ ,  $p=0.5476$ ,  $gl=4$ , se considera una  $p<0.05$  como significativa. \* indica diferencias significativas.

Finalmente, el tamaño de las vacuolas lipídicas mostró una tendencia a un mayor tamaño tanto en el músculo cuádriceps (Figura 18, a) como en el músculo isquiotibial (Figura 18, b) en las crías provenientes de madres SN.



**Figura 18.** Gráficas del tamaño de vacuolas lipídicas del músculo a) cuádriceps e b) isquiotibial. Comparación del área ( $\mu\text{m}^2$ ) para ambos grupos. Se presentan gráficas de barras. El análisis estadístico corresponde a una U de Mann Whitney a)  $U=12$ ,  $p=>0.9999$ ,  $n=5$ ,  $gl=4$  b)  $U=11$ ,  $p=0.8413$ ,  $n=5$ ,  $gl=4$ . Se considera una  $p<0.05$  como significativa. \* indica diferencias significativas

## Discusión

La obesidad infantil constituye una de las condiciones de salud de mayor importancia en la actualidad ya que predispone a los niños que la presentan a desarrollar patologías crónico-degenerativas más adelante en sus vidas (Rizzo et al., 2015, Tenenbaum et al. 2013, Stothard et al, 2009, Castro et al., 2002). Existe evidencia suficiente a favor de la idea que sostiene que la obesidad infantil se condiciona en la vida prenatal en respuesta a la exposición a una dieta alta en grasas (Garibay-nieto & Miranda-lora, 2008, Bayol et al. 2005, Castro et al., 2020). El proceso biológico que subyace a este condicionamiento es poco conocido, debido a que los factores correlacionales que afectan en este período del ciclo vital han sido escasamente investigados, si bien se presume que procesos epigenéticos que definen un fenotipo predictivo/adaptativo están involucrados. Para evaluar si esto es así, sería necesario mostrar que el cuerpo fetal ha sido condicionado previo al nacimiento. Para ello, en este trabajo partimos del supuesto que sustenta que las alteraciones de las interacciones tróficas cuerpo-cerebro subyacen al proceso de condicionamiento comentado.

Los músculos esqueléticos y la inervación motora establecen relaciones tróficas durante la ontogenia (Purves, 1988). De esta manera la presencia de alteraciones en la forma y/o la función de la unidad neuromuscular podrían evidenciar, de estar presentes en fetos a término expuestos a dietas altas en grasas, distorsiones de las interacciones tróficas entre el cuerpo y el cerebro, y dar paso a la identificación de mecanismos de condicionamiento fenotípico asociado con las alteraciones nutricionales gestacionales.

Al respecto, se ha descrito que la inflamación producida por la obesidad altera la estructura de la barrera hematoencefálica, afectando a las estructuras cerebrales tales como la corteza cerebral, el área motora suplementaria y el cerebelo (Vásconez et, al., 2022), áreas relacionadas con el control motor. Además, algunos estudios relacionan la obesidad con afecciones cognitivas en los niños, de las cuales destacan también alteraciones de las habilidades visuoespaciales y motoras (Liang et al., 2014).

En concordancia con estas ideas, observamos que los músculos isquiotibiales y cuádriceps (esenciales para extender y flexionar las extremidades inferiores, además son fundamentales para el mantenimiento de la postura, el adecuado ciclo de marcha y el mantenimiento de la estabilidad patelar) obtenidos de fetos a término expuestos a cantidades elevadas de grasa en la dieta materna mostraron una disminución en el número y tamaño absoluto de las placas neuromusculares a excepción del músculo cuádriceps en la cantidad de placas, al tiempo de un incremento en la intensidad relativa de tinción histoquímica para la enzima acetil colinesterasa.

Estos cambios se produjeron paralelamente con una tendencia a incrementar la tinción para la enzima mitocondrial citocromo oxidasa, acompañada de una tendencia a una mayor cantidad y tamaño de vacuolas lipídicas, en los músculos de fetos a término obtenidos de madres alimentadas con una dieta alta en grasas.

Independientemente del significado funcional de estos cambios, los resultados obtenidos sugieren que la exposición a dietas maternas altas en grasa durante la gestación modifica el soporte trófico neuromuscular, posible evidencia de un proceso de condicionamiento de la trayectoria ontogenética por parte de la dieta alta en grasas. En apoyo a esta posibilidad, se ha reportado que los niños obesos muestran limitaciones de movilidad, fuerza y equilibrio (de Sá Pinto et al., 2006; Tomlinson et al., 2016). Aún cuando se realiza un cambio en la dieta postnatal, las secuelas musculares no disminuyen (Bayol et al., 2005), esto acentúa la importancia del periodo gestacional como una etapa crítica en el desarrollo de las interacciones tróficas neuromusculares.

Para terminar, los hallazgos del presente estudio permiten especular acerca del incremento de la intensidad relativa de tinción para la enzima acetilcolina esterasa. Esta enzima es responsable de degradar a la acetilcolina liberada en la hendidura sináptica. Su incremento pudiese indicar, por tanto, un incremento en la degradación del neurotransmisor en la placa neuromuscular; la debilidad muscular referida anteriormente. Además, la deficiente comunicación entre los nervios y los músculos

podría asociarse a la disminución del tamaño de las placas neuromusculares descritas en este estudio. Simultáneamente, una dieta deficiente en nutrientes contribuye a la deficiencia de colina, la cual es el principal precursor de la acetilcolina. Esta disminución se asocia a daños musculares, así como defectos en el tubo neural de los fetos en mujeres embarazadas (Shaw et. al, 2004) debido a que la acetilcolina influye en la estructura y organización de determinadas regiones del cerebro, en la neurogénesis, mielinización y formación de la sinapsis.

Finalmente, es importante mencionar el incremento de la actividad de la enzima citocromo oxidasa en las fibras musculares esqueléticas. Si, como especulamos, la actividad muscular está reducida puesto que la acetilcolina pudiese estar siendo rápidamente degradada, el incremento de la enzima citocromo oxidasa no debe estar asociada a un aumento de la actividad y fuerza muscular, la que se sabe disminuida en niños obesos (Rahemi et al., 2015). El incremento en la actividad de la citocromo oxidasa pudiera deberse a la necesidad de aumentar la termogénesis en músculo, debido a que la proteína desacoplante 3 (UPC-3), se encuentra principalmente en las mitocondrias de este órgano, promoviendo el transporte de protones y desacoplando la respiración mitocondrial de la fosforilación oxidativa, lo que aumenta la disipación de energía en forma de calor y reduce la eficiencia de la síntesis de ATP. (Apková et al., 2002; Rodríguez et al., 2002; Obregón, 2007). El hecho de que aumente la infiltración grasa inter e intramuscular es compatible con esta posibilidad (ver también Bayol y sus colaboradores, 2005), debido a que la UPC-3 es estimulada en presencia de ácidos grasos procedentes de una dieta hiperlipídica (Villarroya, 2003). En cualquier caso, el aumento de vacuolas lipídicas en las masas musculares estriadas es considerado un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades metabólicas asociadas con la obesidad, como la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2 (Shaw et al., 2010) más tarde en la vida postnatal.



## Conclusión

La exposición gestacional a dietas maternas altas en grasa parece modificar las interacciones tróficas neuromusculares en los fetos a término. Este estudio sienta las bases para especular que la alteración de las interacciones tróficas cuerpo- cerebro pudiese, a través de mecanismos epigenéticos, condicionar el estado de salud-enfermedad del individuo en la vida adulta.

2018S



## Teklad Global 18% Protein Rodent Diet (Sterilizable)

**Product Description-** 2018S is a fixed formula, autoclavable diet manufactured with high quality ingredients and designed to support gestation, lactation, and growth of rodents. 2018S does not contain alfalfa, thus lowering the occurrence of natural phytoestrogens. Typical isoflavone concentrations (daidzein + genistein aglycone equivalents) range from 150 to 250 mg/kg. Exclusion of alfalfa reduces chlorophyll, improving optical imaging clarity. Absence of animal protein and fish meal minimizes the presence of nitrosamines. 2018S is supplemented with additional vitamins to ensure nutritional adequacy after autoclaving. **Also available certified (2018SC), the diet most commonly fed in Envigo Rodent Colonies.**

**Ingredients** (in descending order of inclusion)- Ground wheat, ground corn, wheat middlings, dehulled soybean meal, corn gluten meal, soybean oil, calcium carbonate, dicalcium phosphate, brewers dried yeast, iodized salt, L-lysine, DL-methionine, choline chloride, kaolin, menadione sodium bisulfite complex (source of vitamin K activity), magnesium oxide, vitamin E acetate, calcium pantothenate, thiamin mononitrate, manganese oxide, niacin, ferrous sulfate, zinc oxide, riboflavin, vitamin A acetate, pyridoxine hydrochloride, copper sulfate, vitamin B<sub>12</sub> supplement, folic acid, calcium iodate, biotin, vitamin D<sub>3</sub> supplement, cobalt carbonate.

Standard Product Form: **Pellet**

Macronutrients		
Crude Protein	%	18.6
Fat (ether extract) <sup>a</sup>	%	6.2
Carbohydrate (available) <sup>b</sup>	%	44.2
Crude Fiber	%	3.5
Neutral Detergent Fiber <sup>c</sup>	%	14.7
Ash	%	5.3
Energy Density <sup>d</sup>	kcal/g (kJ/g)	3.1 (13.0)
Calories from Protein	%	24
Calories from Fat	%	18
Calories from Carbohydrate	%	58

Minerals		
Calcium	%	1.0
Phosphorus	%	0.7
Non-Phytate Phosphorus	%	0.4
Sodium	%	0.2
Potassium	%	0.6
Chloride	%	0.4
Magnesium	%	0.2
Zinc	mg/kg	70
Manganese	mg/kg	100
Copper	mg/kg	15
Iodine	mg/kg	6
Iron	mg/kg	200
Selenium	mg/kg	0.23

Amino Acids		
Aspartic Acid	%	1.4
Glutamic Acid	%	3.4
Alanine	%	1.1
Glycine	%	0.8
Threonine	%	0.7
Proline	%	1.6
Serine	%	1.1
Leucine	%	1.8
Isoleucine	%	0.8
Valine	%	0.9
Phenylalanine	%	1.0
Tyrosine	%	0.6
Methionine	%	0.6
Cystine	%	0.3
Lysine	%	1.1
Histidine	%	0.4
Arginine	%	1.0
Tryptophan	%	0.2

Vitamins		
Vitamin A <sup>e,f</sup>	IU/g	30.0
Vitamin D <sub>3</sub> <sup>e,g</sup>	IU/g	2.0
Vitamin E	IU/kg	135
Vitamin K <sub>3</sub> (menadione)	mg/kg	100
Vitamin B <sub>1</sub> (thiamin)	mg/kg	117
Vitamin B <sub>2</sub> (riboflavin)	mg/kg	27
Niacin (nicotinic acid)	mg/kg	115
Vitamin B <sub>6</sub> (pyridoxine)	mg/kg	26
Pantothenic Acid	mg/kg	140
Vitamin B <sub>12</sub> (cyanocobalamin)	mg/kg	0.15
Biotin	mg/kg	0.90
Folate	mg/kg	9
Choline	mg/kg	1200

Fatty Acids		
C16:0 Palmitic	%	0.7
C18:0 Stearic	%	0.2
C18:1ω9 Oleic	%	1.2
C18:2ω6 Linoleic	%	3.1
C18:3ω3 Linolenic	%	0.3
Total Saturated	%	0.9
Total Monounsaturated	%	1.3
Total Polyunsaturated	%	3.4

Other		
Cholesterol	mg/kg	--

<sup>a</sup> Ether extract is used to measure fat in pelleted diets, while an acid hydrolysis method is required to recover fat in extruded diets. Compared to ether extract, the fat value for acid hydrolysis will be approximately 1% point higher.

<sup>b</sup> Carbohydrate (available) is calculated by subtracting neutral detergent fiber from total carbohydrates.

<sup>c</sup> Neutral detergent fiber is an estimate of insoluble fiber, including cellulose, hemicellulose, and lignin. Crude fiber methodology underestimates total fiber.

<sup>d</sup> Energy density is a calculated estimate of metabolizable energy based on the Atwater factors assigning 4 kcal/g to protein, 9 kcal/g to fat, and 4 kcal/g to available carbohydrate.

<sup>e</sup> Indicates added amount but does not account for contribution from other ingredients.

<sup>f</sup> 1 IU vitamin A = 0.3 µg retinol

<sup>g</sup> 1 IU vitamin D = 25 ng cholecalciferol

For nutrients not listed, insufficient data is available to quantify.

Nutrient data represent the best information available, calculated from published values and direct analytical testing of raw materials and finished product. Nutrient values may vary due to the natural variations in the ingredients, analysis, and effects of processing.

Teklad Diets are designed and manufactured for research purposes only.



© 2015 Envigo

Teklad Diets + Madison WI + [envigo.com](http://envigo.com) + [tekladinfo@envigo.com](mailto:tekladinfo@envigo.com) + (800) 483-5523

0915

**Anexo 1. Especificaciones de la dieta estándar para el grupo NN. Las siguientes tablas resumen las características dietéticas relevantes.**

Teklad Custom Diet

**TD.06414**



**Adjusted Calories Diet (60/Fat)**

Formula	g/Kg
Casein	265.0
L-Cystine	4.0
Maltodextrin	160.0
Sucrose	90.0
Lard	310.0
Soybean Oil	30.0
Cellulose	65.5
Mineral Mix, AIN-93G-MX (94046)	48.0
Calcium Phosphate, dibasic	3.4
Vitamin Mix, AIN-93-VX (94047)	21.0
Choline Bitartrate	3.0
Blue Food Color	0.1

**Footnote**  
 Approx. 60% of total calories come from fat. Designed with similarities to Research Diets, Inc. formula D12492. For the series TD 06414-TD 06416. Approximate fatty acid profile (% of total fat): 36% saturated, 41% monounsaturated, 23% polyunsaturated.

Selected Nutrient Information <sup>1</sup>		
	% by weight	% kcal from
Protein	23.5	18.3
Carbohydrate	27.3	21.4
Fat	34.3	60.3
<b>Kcal/g</b>	<b>5.1</b>	

<sup>1</sup> Values are calculated from ingredient analysis or manufacturer data

**Speak With A Nutritionist**  
 + **(800) 483-5523**  
 + [askanutritionist@envigo.com](mailto:askanutritionist@envigo.com)  
*Teklad diets are designed & manufactured for research purposes only.*

**Key Features**  
 + Purified Diet  
 + Diet Induced Obesity  
 + High Fat

**Key Planning Information**  
 + Products are made fresh to order  
 + Store product at 4°C or lower  
 + Use within 6 months (applicable to most diets)  
 + Box labeled with product name, manufacturing date, and lot number  
 + Replace diet at minimum once per week  
*More frequent replacement may be advised*  
 + Lead time:  
 · 2 weeks non-irradiated  
 · 4 weeks irradiated

**Product Specific Information**  
 + 1/2" Pellet or Powder (free flowing)  
 + Minimum order 3 Kg  
 + Irradiation available upon request

**Options (fees will apply)**  
 + Rush order (pending availability)  
 + Irradiation (see Product Specific Information)  
 + Vacuum packaging (1 and 2 Kg)

**Contact Us**  
 Obtain pricing · Check order status  
 + [teklad@envigo.com](mailto:teklad@envigo.com)  
 + **(800) 483-5523**



**International Inquiry (outside USA or Canada)**  
 + [askanutritionist@envigo.com](mailto:askanutritionist@envigo.com)

**Place Your Order (USA & Canada)**  
 Please Choose One  
 + [www.envigo.com/teklad-orders](http://www.envigo.com/teklad-orders)  
 + [tekladorders@envigo.com](mailto:tekladorders@envigo.com)  
 + **(800) 483-5523**  
 + **(608) 277-2066** facsimile

© 2015 Envigo

02/18/16

Envigo Teklad Diets + Madison WI + [envigo.com](http://envigo.com) + [tekladinfo@envigo.com](mailto:tekladinfo@envigo.com) + (800) 483-5523

**Anexo 2.** Especificaciones de la dieta alta en grasa para el grupo SN. Las siguientes tablas resumen las características dietéticas relevantes. Las dietas con 60% de calorías provenientes de grasas se usan comúnmente para inducir la obesidad en roedores. Si bien se considera extremo en comparación con el consumo típico de grasas en humanos, estas dietas son efectivas para iniciar un rápido aumento de peso en la mayoría de los roedores.

## Referencias

- Akın, O., Eker, İ., Arslan, M., Taşdemir, S., Taşçılar, M. E., Ulaş, Ü. H., Yeşilkaya, E., & Ünay, B. (2016a). Association of nerve conduction impairment and insulin resistance in children with obesity. *Child's Nervous System*, 32(11), 2219–2224. <https://doi.org/10.1007/s00381-016-3210-3>
- Apková, M. C. ˇ, Houštěk, J., Hansíková, H., Hainer, V., Kunešová, M., & Zeman, J. (2002). PAPER Activities of cytochrome c oxidase and citrate synthase in lymphocytes of obese and normal-weight subjects. *International Journal of Obesity*, 26, 1110–1117. <https://doi.org/10.1038=sj.ijo.0802055>
- Armitage, J. A., Poston, L., & David Taylor, P. (2008). Developmental Origins of Obesity and the Metabolic Syndrome: The Role of Maternal Obesity The Obesity Epidemic. In *Front Horm Res. Basel, Karger* (Vol. 36).
- Ashino, N. G., Saito, K. N., Souza, F. D., Nakutz, F. S., Roman, E. A., Velloso, L. A., Torsoni, A. S., & Torsoni, M. A. (2012). Maternal high-fat feeding through pregnancy and lactation predisposes mouse offspring to molecular insulin resistance and fatty liver. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(4), 341–348. <https://doi.org/10.1016/j.inutbio.2010.12.011>
- Barker, D. J. P., & Osmond, C. (1986). Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease.
- Baum, P., Petroff, D., Classen, J., Kiess, W., & Blüher, S. (2013). Dysfunction of Autonomic Nervous System in Childhood Obesity: A Cross-Sectional Study. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054546>
- Bayol, S. A., Simbi, B. H., & Stickland, N. C. (2005). A maternal cafeteria diet during gestation and lactation promotes adiposity and impairs skeletal muscle development and metabolism in rat offspring at weaning. *Journal of Physiology*, 567(3). <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.088989>.
- Cabana, J., Sabatelli, D., Toniatti, M., Flores, A., Conti, R., Pasqualini, D., Gaete, L., & Gil, S. M. (2020). Developmental origins of health and disease concept: The environment in the first 1000 days of life and its association with noncommunicable diseases. *Archivos Argentinos de Pediatría*, 118(4), S118–S129. <https://doi.org/10.5546/aap.2020.S118>

- Castro, L. C., Avina, R. L., & Williams, L. (2002). Maternal obesity and pregnancy outcomes. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 14, 601–606. <https://doi.org/10.1097/01.gco.0000045486.15021.c9>
- Cervantes Ramírez, D. L., Haro Acosta, M. E., Ayala Figueroa, R. I., Haro Estrada, I., & Fausto Pérez, J. A. (2019). Prevalencia de obesidad y ganancia de peso en mujeres embarazadas. *Atención Familiar*, 26(2), 43. <https://doi.org/10.22201/facmed.14058871p.2019.2.68824>
- Cruz Guzmán, O. D. R., Chávez García, A. L., & Rodríguez-Cruz, M. (2012). Muscular dystrophies at different ages: Metabolic and endocrine alterations. In *International Journal of Endocrinology* (Vol. 2012). <https://doi.org/10.1155/2012/485376>
- De Sá Pinto, A. L., de Barros Holanda, P. M., Radu, A. S., Villares, S. M. F., & Lima, F. R. (2006). Musculoskeletal findings in obese children. *Journal of Paediatrics and Child Health*, 42(6), 341–344. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1754.2006.00869.x>
- Du, M., Yan, X., Tong, J. F., Zhao, J., & Zhu, M. J. (2010). Maternal obesity, inflammation, and fetal skeletal muscle development. In *Biology of Reproduction* (Vol. 82, Issue 1, pp. 4–12). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.077099>
- Erdem, E., Lin, A., Kogan, B. A., & Feustel, P. J. (2006). Association of elimination dysfunction and body mass index. *Journal of Pediatric Urology*, 2(4), 364–367. <https://doi.org/10.1016/j.ipurol.2006.05.002>
- Friedman, J. E. (2002). Metabolismo de la Glucosa en el Músculo Esquelético. *PubliCE 1 PubliCE*. <https://g-se.com/metabolismo-de-la-glucosa-en-el-musculo-esqueletico-134-sa-n57cfb27107536>.
- Garibay-nieto, N., & Miranda-lora, A. L. (2008). Artemisa Impacto de la programación fetal y la nutrición durante el primer año de vida en el desarrollo de obesidad y sus complicaciones. *Bol Med Hosp Infant Mex*, 65(162).
- Guven, A., Giramonti, K., & Kogan, B. A. (2007). The Effect of Obesity on Treatment Efficacy in Children With Nocturnal Enuresis and Voiding Dysfunction. *Journal of Urology*, 178(4). <https://doi.org/10.1016/j.juro.2007.05.165>
- Hoffman, M. L., Reed, S. A., Pillai, S. M., Jones, A. K., McFadden, K. K., Zinn, S. A., & Govoni, K. E. (2017). Physiology and endocrinology symposium: The

- effects of poor maternal nutrition during gestation on offspring postnatal growth and metabolism. *Journal of Animal Science*, 95(5), 2222–2232.  
<https://doi.org/10.2527/jas2016.1229>
- Hong, A. R., Hong, S. M., & Shin, Y. A. (2014). Effects of resistance training on muscle strength, endurance, and motor unit according to ciliary neurotrophic factor polymorphism in male college students. *Journal of sports science & medicine*, 13(3), 680.
  - Ince, H., Taşdemir, H. A., Aydın, M., Ozyürek, H., & Tilki, H. E. (2015). Evaluation of Nerve Conduction Studies in Obese Children with Insulin Resistance or Impaired Glucose Tolerance. *Journal of Child Neurology*, 30(8).  
<https://doi.org/10.1177/0883073814550188>
  - Ismail-Beigi, F., Catalano, P. M., & Hanson, R. W. (2006). Metabolic programming: fetal origins of obesity and metabolic syndrome in the adult. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 291, 439–440.  
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00105.2006.-Exposure>
  - Kannan, S., & Bhaskaran, R. S. (2019). Sustained obesity reduces litter size by decreasing proteins regulating folliculogenesis and ovulation in rats - A cafeteria diet model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 519(3).  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.09.025>
  - Khan N., Smith M.T. (2015). Neurotrophins and Neuropathic Pain: Role in Pathobiology. *Molecules*. Jun 9;20(6):10657-88. doi: 10.3390/molecules200610657. PMID: 26065639; PMCID: PMC6272404.
  - Krul, M., van der Wouden, J. C., Schellevis, F. G., van Suijlekom-Smit, L. W. A., & Koes, B. W. (2009). Musculoskeletal problems in overweight and obese children. *Annals of Family Medicine*, 7(4), 352–356.  
<https://doi.org/10.1370/afm.1005>.
  - Langley, M. R., Yoon, H., Kim, H. N., Choi, C. il, Simon, W., Kleppe, L., Lanza, I. R., LeBrasseur, N. K., Matveyenko, A., & Scarisbrick, I. A. (2020). High fat diet consumption results in mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and oligodendrocyte loss in the central nervous system. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1866(3).  
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.165630>

- Lepe, M., Bacardí Gascón, M., Castañeda-González, L. M., Pérez Morales, M. E., & Jiménez Cruz, A. (2011). Effect of maternal obesity on lactation: systematic review. *Nutrición Hospitalaria*, 26(6). <https://doi.org/10.3305/nh.2011.26.6.5388>
- Liang, J., Matheson, B. E., Kaye, W. H., & Boutelle, K. N. (2014). Neurocognitive correlates of obesity and obesity-related behaviors in children and adolescents. *International journal of obesity*, 38(4), 494-506.
- Marcondes, F. K., Bianchi, F. J., Tanno, A. P., & Marcondes, F. K. (2002). Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. In *Braz. J. Biol* (Vol. 62, Issue 4A).
- Martí-Nicolovius, M. (2022). Efectos del sobrepeso y la obesidad en las funciones cognitivas de niños y adolescentes. *Rev. neurol.(Ed. impr.)*, 59-65.
- Maynard Robert Lewis, & Downes Noel. (2019). *Anatomy and Histology of the Laboratory Rat in Toxicology and Biomedical Research*.
- Obregón María Jesús. (2007). Obesidad, termogénesis y hormonas tiroideas.
- Paul, T. K., Sciacca, R. R., Bier, M., Rodriguez, J., Song, S., & Giardina, E. G. v. (2015). Size Misperception Among Overweight and Obese Families. *Journal of General Internal Medicine*, 30(1), 43–50. <https://doi.org/10.1007/s11606-014-3002-y>
- Paulis, W. D., Silva, S., Koes, B. W., & van Middelkoop, M. (2014). Overweight and obesity are associated with musculoskeletal complaints as early as childhood: a systematic review. *Obesity Reviews*, 15(1), 52-67.
- Perea-Martínez, A., Eugenia Bárcena-Sobrino, D., Rodríguez-Herrera, R., Sydney Greenawalt-Rodríguez, D., Carbajal-Rodríguez, L., & Zarco-Román, J. (2009). *Acta Pediátrica de México Volumen 30, Núm. 3, mayo-junio*.
- Perera, O. P., Nakash, B., Selechnik, S., Serrano Ávila, M., & Ortega, F. V. (2006). Impacto de la obesidad pregestacional en el estado nutricional de mujeres embarazadas de la Ciudad de México (Vol. 74). [www.revistasmedicasmexicanas.com.mx](http://www.revistasmedicasmexicanas.com.mx)
- Pillen, S., Scholten, R. R., Zwarts, M. J., & Verrips, A. (2003). Quantitative skeletal muscle ultrasonography in children with suspected neuromuscular disease. *Muscle and Nerve*, 27(6). <https://doi.org/10.1002/mus.10385>.
- Purves, D. (1988). *Body and brain: a trophic theory of neural connections*.

Harvard University Press.

- Ramírez, D. L. C., Acosta, M. E. H., Figueroa, R. I. A., Estrada, I. H., & Pérez, J. A. F. (2019). Prevalencia de obesidad y ganancia de peso en mujeres embarazadas. *Atención Familiar*, 26(2), 43-47.
- Rahemi, H., Nigam, N., & Wakeling, J. M. (2015). The effect of intramuscular fat on skeletal muscle mechanics: Implications for the elderly and obese. *Journal of the Royal Society Interface*, 12(109). <https://doi.org/10.1098/rsif.2015.0365>
- Rizzo, G. S., & Sen, S. (2015). Maternal obesity and immune dysregulation in mother and infant: A review of the evidence. In *Paediatric Respiratory Reviews* (Vol. 16, Issue 4, pp. 251–257). W.B. Saunders Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2014.10.005>
- Rodríguez, V. M., Macarulla, M. T., Chávarri, M., & Portillo, M. P. (2002). Papel de las proteínas desacoplantes en la obesidad. In *Anales del sistema sanitario de Navarra* (Vol. 25, pp. 65-77).
- Ruíz, M. M., Carvajal, J. E., Nuñez, A. C., Agüero, S. D., & Díaz-Narváez, V. P. (2015). Comparación del desarrollo psicomotor en preescolares chilenos con normopeso versus sobrepeso/obesidad. *Nutricion Hospitalaria*, 32(1). <https://doi.org/10.3305/nh.2015.32.1.9060>
- Shaw, C. S., Clark, J., & Wagenmakers, A. J. M. (2010). The effect of exercise and nutrition on intramuscular fat metabolism and insulin sensitivity. In *Annual Review of Nutrition* (Vol. 30, pp. 13–34). <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.012809.104817>
- Shaw GM, Carmichael SL, Yang W, Selvin S, Schaffer DM (2004). «Periconceptional dietary intake of choline and betaine and neural tube defects in offspring». *American Journal of Epidemiology* 160 (2): 102-9. PMID 15234930. doi:10.1093/aje/kwh187.
- Sieck Gary C., & Prakash Y. S. (1997). Morphological Adaptations of Neuromuscular Junctions Depend on Fiber Type. *Canadian Journal of Applied Physiology*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1139/h97-014>
- Stothard, K. J., Tennant, P. W. G., Bell, R., & Rankin, J. (2009). Maternal overweight and obesity and the risk of congenital anomalies: A systematic review and meta-analysis. In *JAMA* (Vol. 301, Issue 6).



<https://doi.org/10.1001/jama.2009.113>

- Stovitz, S. D., Pardee, P. E., Vazquez, G., Duval, S., & Schwimmer, J. B. (2008). Musculoskeletal pain in obese children and adolescents. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*, 97(4), 489–493. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2008.00724.x>
- Suárez Román, G., Jesús Perera Calderín, A., Clapés Hernández, S., Fernández Romero, T., & Egaña Morales, E. (s.f.). Estandarización de un modelo para inducir obesidad en ratas Standardization of model to induce obesity in rats.
- Suzuki, K. (2018). The developing world of DOHaD. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 9(3), 266–269. <https://doi.org/10.1017/S2040174417000691>
- Tenenbaum-Gavish, K., & Hod, M. (2013). Impact of maternal obesity on fetal health. In *Fetal Diagnosis and Therapy* (Vol. 34, Issue 1). <https://doi.org/10.1159/000350170>
- Tomlinson, D. J., Erskine, R. M., Morse, C. I., Winwood, K., & Onambélé-Pearson, G. (2016). The impact of obesity on skeletal muscle strength and structure through adolescence to old age. In *Biogerontology* (Vol. 17, Issue 3, pp. 467–483). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s10522-015-9626-4>
- Vásconez-González, J., Delgado-Moreira, K., López-Molina, B., Gámez-Rivera, E., Diaz, A. M., Ortiz-Prado, E., & Vargas-Córdova, R. (2022). Alteraciones En El Sistema Nervioso Producido Por La Obesidad. *Revista Ecuatoriana de Neurología*, 31(2), 65-73.
- Villarroya, F. (2003). La proteína desacoplante mitocondrial UCP3, ¿un nuevo actor en el metabolismo muscular de los ácidos grasos? *Clínica e investigación en arteriosclerosis*, 15(3), 114-123.