



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Análisis de la expresión de genes que intervienen en la atrofia del musculo esquelético en un modelo de crías F1 alimentadas con dieta control o alta en grasas e intervenidas con el flavonoide (-)-epicatequina descendientes de madres control o de madres obesas”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Ana Luisa Alvarez Chávez

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Ileana Patricia Canto Cetina
Facultad de Medicina, UNAM
(Unidad Periférica de Investigación en Obesidad)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Victoria Chagoya de Sánchez
Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Samuel Canizales Quinteros
Facultad de Química (Unidad periférica INMEGEN), UNAM

CIUDAD DE MÉXICO

SEPTIEMBRE, 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

Análisis de la expresión de genes que intervienen en la atrofia del musculo esquelético en un modelo de crías F1 alimentadas con dieta control o alta en grasas e intervenidas con el flavonoide (-)-epicatequina descendientes de madres control o de madres obesas

que presenté para obtener el grado de doctora, es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

Ana Luisa Alvarez Chávez

517025901

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente financiado por el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación SEP-CONACYT, Convocatoria de Investigación Científica Básica 2017-2018, CONACYT México, apoyo: A1-S-9740, y por el Programa al Fortalecimiento y Desarrollo de la Infraestructura Científica y Tecnológica (CONACYT) México, apoyo: 250786.

Ana Luisa Álvarez Chávez recibió la beca Apoyo para Ayudantes de Investigador Nivel III o Emérito del Sistema Nacional de Investigadores (S.N.I.), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México).

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ) por el apoyo brindado a través del acceso a su infraestructura, colaboración con su personal experto y ambiente propicio para la educación y el trabajo de investigación

A la Dra. Elena Zambrano González del Departamento de Biología de la Reproducción (INCMNSZ), por su importante colaboración para el desarrollo de este modelo animal de investigación.

Al Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, por la valiosa aportación del flavonoide (-)- epicatequina en este proyecto.

ÍNDICE

	Pág.
ABREVIATURAS	11
1. RESUMEN	14
2. ABSTRACT	16
3. INTRODUCCIÓN.....	18
3.1. Obesidad	18
3.2. Obesidad materna y programación fetal	21
3.3. Obesidad y atrofia muscular	24
3.4. Atrofia muscular	31
3.5. Células satélite y diferenciación de músculo esquelético.	38
3.6. (-)-epicatequina y músculo esquelético	40
4. ANTECEDENTES	45
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	53
6. OBJETIVOS	54
6.1. Objetivo general	54
6.2. Objetivos específicos	54
7. HIPÓTESIS.....	56
8. METODOLOGÍA	56
8.1. Modelo animal	56
8.2. Extracción de ARN de tejido músculo esquelético gastrocnemio	60
8.3. Análisis de expresión génica	61
8.4. Expresión proteica mediante Western blot	62
8.5. Análisis estadístico	64
9. RESULTADOS.....	66

9.1. Análisis de la expresión relativa de los genes involucrados en la atrofia o síntesis de proteínas musculares en el músculo gastrocnemio de los grupos experimentales.	66
9.2. Análisis de los niveles de las proteínas relacionadas con atrofia o síntesis de proteínas musculares en el músculo gastrocnemio de los grupos experimentales a través de Western blot.	70
9.3. Análisis de los niveles de las proteínas relacionadas con atrofia o síntesis de proteínas musculares en el músculo sóleo de los grupos experimentales a través de Western blot.	79
9.4. Análisis de los niveles de la proteína relacionada con la diferenciación musculoesquelética en el músculo gastrocnemio y sóleo de los grupos experimentales a través de Western blot.	85
10. DISCUSIÓN	88
11. RESUMEN DE RESULTADOS	97
12. RESUMEN GRÁFICO DE RESULTADOS.....	98
13. CONCLUSIONES	100
14. PERSPECTIVAS	100
15. TABLAS SUPLEMENTARIAS.....	102
16. REFERENCIAS.....	108

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1. Comparativo de la prevalencia nacional de sobrepeso y obesidad en población de 5 a 11 años de edad, de la ENN-1999 y Ensanut 2006, 2012, 2018-19, 2020 y 2021, por sexo (tomado de Shamah-Levy et al., 2022).	19
Fig. 2. Comparación de las categorías de IMC en hombres y mujeres con 20 años o más de edad Ensanut 2012 y 2021. (tomado de Shamah-Levy et al., 2022).	20
Fig. 3. Comparación de las prevalencias de sobrepeso y obesidad en mujeres de 20 a 49 años de edad, participantes en la ENN 88, ENN 99, Ensanut 2006, 2012, 2020 y 2021 (tomado de Shamah-Levy et al., 2022).	21
Fig. 4. Cambios estructurales e inflamatorios en el músculo en el contexto de la obesidad. Alteraciones en el tejido adiposo secundarios a la obesidad y consecuencias musculoesqueléticas de la inflamación leve y crónica sobre el tejido musculoesquelético (tomado de Khan et al., 2015).	29
Fig. 5. Mecanismos de anabolismo y catabolismo frente a estímulos externos en el músculo esquelético. Abreviaciones: TNF α (factor de necrosis tumoral alpha), IGF1 (factor de crecimiento insulínico tipo 1), IRS1 (sustrato del receptor de insulina 1), PI3K (fosfoinositol 3-cinasa), PIP3 (fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato), AKT (proteína cinasa B), mTOR (diana de rapamicina en células de mamífero), p70S6K (proteína cinasa ribosómica S6 beta-1), NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas), MURF1 (ubiquitina ligasa muscular E3 con dominio de dedos de zinc RING), MAFbx (ubiquitina ligasa muscular E3 con caja F), FOXO (factor de transcripción Forkhead O1) (tomado de Sishi et al., 2011).	36
Fig. 6. Índice de adiposidad en los grupos de experimentación al día 245 posnatal (F1). Los descendientes de madres con obesidad muestran un aumento del índice de adiposidad, mientras que el tratamiento durante 15 días con Epi, reduce este parámetro. a p <0.01 vs Ctr; b p <0.01 vs Ctr + Epi; c p <0.05 vs Ctr + Epi; d p <0.01 vs MO (tomado De los Santos et al., 2020).	46
Fig. 7. Pesos de diferentes depósitos de grasa en los grupos de experimentación al día 245 posnatal (F1) A. Grasa retroperitoneal B. Grasa gonadal C. Grasa mesentérica y D. Grasa pancreática. Los descendientes de madres con obesidad presentan un aumento en el peso de diversos depósitos de grasa, mientras que la administración de Epi durante 15 días, disminuye el	

peso de estos depósitos. a $p < 0.01$ vs Ctr; b $p < 0.01$ vs Ctr + Epi; c $P < 0.01$ vs MO; d $p < 0.05$ vs Ctr (tomado De los Santos et al., 2020)..... 47

Fig. 8. Características del tejido adiposo de los grupos de experimentación al día 245 posnatal (F1). Comparación del tamaño de los adipocitos. Los adipocitos de la progenie de madres con obesidad presentan un aumento en su tamaño, el tratamiento con Epi durante 15 días disminuye el tamaño de los adipocitos. a $p < 0.01$ vs Ctr; b $p < 0.01$ vs Ctr + Epi; c $P < 0.01$ vs MO (De los Santos et al., 2020). 48

Fig. 9. Efecto de la Epi en la masa muscular de la progenie de 110 días de vida posnatal de madres obesas y madre control, con tratamiento corto de 2 semanas y largo de 13 semanas de Epi. La progenie de madres con obesidad presenta una disminución de masa magra, mientras que el tratamiento con Epi durante 13 semanas induce un aumento en el porcentaje de masa magra. a $p < 0.01$ vs Ctr; c $p < 0.01$ vs MO (De los Santos et al., 2019). 51

Fig. 10. Modelo de obesidad. Ratas descendientes de madres control con dieta posnatal chow sin Epi (C), ratas descendientes de madres control con dieta posnatal chow intervenidas con Epi durante 13 semanas (C + Epi), ratas descendientes de madres obesas con dieta posnatal chow sin Epi (MO), ratas descendientes de madres obesas con dieta posnatal chow intervenidas con Epi durante 13 semanas (MO + Epi), ratas descendientes de madres control con dieta posnatal alta en grasas sin Epi (CHFD), ratas descendientes de madres control con dieta posnatal alta en grasas intervenidas con Epi durante 13 semanas (CHFD + Epi), ratas descendientes de madres obesas con dieta posnatal alta en grasas sin Epi (MOHFD) y ratas descendientes de madres obesas con dieta posnatal alta en grasas tratadas con Epi durante 13 semanas (MOHFD + Epi). 60

Fig. 11. Expresión relativa del ARNm de *Murf1* en músculo gastrocnemio. La administración de Epi durante 13 semanas disminuyó la expresión transcripcional de *Murf1* en los grupos C + Epi y MO + Epi en comparación con los grupos C y MO en músculo gastrocnemio. A) Resultados de la prueba ANOVA de dos vías mostrando las variables cuya influencia es significativa en el modelo de experimentación. B) Expresión relativa de *Murf1* ARNm en músculo esquelético de gastrocnemio. 67

Fig. 12. Expresión relativa de *MAFbx* en músculo gastrocnemio. La dieta materna y/o la administración de Epi durante 13 semanas no modificaron la expresión de *MAFbx*. A) Expresión relativa de *MAFbx* ARNm en músculo esquelético de gastrocnemio. 67

Fig. 13. Expresión relativa de *NFκB* en músculo gastrocnemio. La administración de Epi durante 13 semanas disminuyó la expresión transcripcional de *NFκB* en los grupos C + Epi y MO + Epi en comparación con los grupos C y MO en este músculo. A) Resultados de la prueba ANOVA de dos vías mostrando las variables cuya influencia es significativa en el modelo de experimentación. B) Expresión relativa de *NFκB* ARNm en músculo esquelético de gastrocnemio. 68

Fig. 14. Expresión relativa de *p70S6K-α* en músculo gastrocnemio. No se observaron diferencias significativas en la expresión de *p70S6K-α* en ninguno de los grupos experimentales en este músculo. A) Expresión relativa de *p70S6K-α* ARNm en músculo esquelético de gastrocnemio. 69

Fig. 15. Expresión relativa de la proteína de MURF en músculo gastrocnemio. Se puede observar que los grupos con una dieta posnatal alta en grasas (CHFD, CHFD + Epi, MOHFD y MOHFD + Epi) presentan un aumento en la expresión proteica de MURF en comparación con los grupos con una dieta posnatal chow (C, C + Epi, MO, MO + Epi) ($p < 0.001$). El grupo experimental MOHFD presenta un aumento significativo en la expresión de MURF en comparación con grupo C ($p = 0.047$) y la administración de Epi no disminuyó la expresión de MURF (C vs MOHFD + Epi) ($p = 0.026$) en este músculo. A) Western Blot representativo de la expresión proteica de MURF y GAPDH en los grupos experimentales. B) Resultados de la prueba ANOVA de tres vías mostrando las variables cuya influencia es significativa en el modelo de experimentación. C) Resultados del análisis por densitometría de la expresión proteica de MURF. 72

Fig. 16. Expresión relativa de la proteína de MAFbx en músculo gastrocnemio. La figura muestra que los grupos experimentales con una dieta posnatal alta en grasas (CHFD, CHFD + Epi, MOHFD y MOHFD + Epi), tienen un aumento en la expresión de MAFbx en comparación de aquellos con una dieta posnatal chow (C, C + Epi, MO, MO + Epi) ($p = 0.01$). No se observa influencia de la dieta materna ni del tratamiento con epicatequina, así como tampoco diferencias estadísticas entre los diferentes grupos de experimentación. A) Western Blot representativo de la expresión proteica de MAFbx y GAPDH en los grupos experimentales. B) Resultados de la prueba ANOVA de tres vías mostrando las variables cuya influencia es significativa en el modelo de experimentación. C) Resultados del análisis por densitometría de la expresión proteica de MAFbx. 73

Fig. 17. Expresión relativa de la proteína total y fosforilada de NFκB en músculo

gastrocnemio. Se describe un aumento significativo en la expresión de NFκB en los grupos con dieta posnatal alta en grasas (CHFD, CHFD + Epi, MOHFD y MOHFD + Epi) en comparación de los grupos con dieta posnatal chow (C, C + Epi, MO, MO + Epi), no se observaron cambios en la fosforilación de la proteína inducidos por alguna de las variables. El grupo MOHFD tiene un aumento significativo en la expresión total de NFκB contra el grupo C ($p = 0.018$), el grupo MOHFD presenta un aumento en la expresión total de NFκB en comparación del grupo MO ($p = 0.034$). No hay cambios en la fosforilación de la proteína entre grupos de experimentación. A) Western Blot representativo de la expresión de la proteína total y fosforilada de NFκB y GAPDH en los grupos experimentales. B) Resultados de la prueba ANOVA de tres vías para la expresión total de la proteína NFκB, mostrando las variables cuya influencia es significativa en el modelo de experimentación. C) Resultados del análisis por densitometría de la expresión proteica de NFκB y D) la relación entre la proteína total y fosforilada de NFκB. 76

Fig. 18. Expresión relativa de la proteína total y fosforilada de p70S6K-α en músculo

gastrocnemio. No se observaron diferencias significativas en la expresión de la cinasa p70S6K-α en ninguno de los grupos experimentales bajo alguna de las variables en estudio. A) Western Blot representativo de la expresión de la proteína total y fosforilada de p70S6K-α y GAPDH en los grupos experimentales. B) Resultados del análisis por densitometría de la expresión proteica de p70S6K-α y C) la relación entre la proteína total y fosforilada de p70S6K-α..... 78

Fig. 19. Expresión relativa de la proteína MURF en músculo sóleo. La dieta materna, la dieta posnatal, o la administración de Epi no inducen cambios en la expresión proteica de MURF en músculo sóleo. A) Western Blot representativo de la expresión proteica de MURF y GAPDH en los grupos experimentales. B) Resultados del análisis por densitometría de la expresión proteica de MURF. 80

Fig. 20. Expresión relativa de la proteína de MAFbx en músculo sóleo. Los grupos con dieta posnatal alta en grasas (CHFD, CHFD + Epi, MOHFD y MOHFD + Epi) presentan un aumento significativo en la expresión proteica de MAFbx en comparación de los grupos con una dieta posnatal chow (C, C + Epi, MO, MO + Epi) ($p = 0.0475$). El grupo experimental MOHFD presenta una tendencia al aumento en la expresión de MAFbx en comparación del grupo C ($p = 0.0538$). A) Western Blot representativo de la expresión proteica de MAFbx y GAPDH en los grupos experimentales. B) Resultados de la prueba ANOVA de tres vías mostrando las variables

cuya influencia es significativa en el modelo de experimentación. C) Resultados del análisis por densitometría de la expresión proteica de MAFbx..... 82

Fig. 21. Expresión relativa de la proteína total y fosforilada de p70S6K- α en músculo sóleo.

La dieta materna, la dieta posnatal alta en grasas ni el tratamiento con Epi, inducen cambios en la expresión de la cinasa p70S6K- α o su fosforilación en ninguno de los grupos experimentales. A) Western Blot representativo de la expresión de la proteína total y fosforilada de p70S6K- α y GAPDH en los grupos experimentales. B) Resultados del análisis por densitometría de la expresión proteica de p70S6K- α y C) la relación entre la proteína total y fosforilada de p70S6K- α 84

Fig. 22. Expresión relativa de la proteína MyoD en músculo gastrocnemio. Se puede observar que los grupos con dieta materna alta en grasas (MO, MO + Epi, MOHFD y MOHFD + Epi) presentan un aumento en la expresión de MyoD en comparación de los grupos con dieta materna chow (C, C + Epi, CHFD y CHFD + Epi) ($p = 0.0061$). A) Western Blot representativo de la expresión proteica de MyoD y GAPDH en los grupos experimentales. B) Resultados de la prueba ANOVA de tres vías mostrando las variables cuya influencia es significativa en el modelo de experimentación. C) Resultados del análisis por densitometría de la expresión proteica de MyoD. 86

Fig. 23. Expresión relativa de la proteína de MyoD en músculo sóleo. No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los grupos experimentales. A) Western Blot representativo de la expresión proteica de MyoD y GAPDH en los grupos experimentales. B) Resultados del análisis por densitometría de la expresión proteica de MyoD..... 88

ABREVIATURAS

5C-RFM _s	metabolitos de fisión de anillos 5C
PDK1	piruvato deshidrogenasa quinasa 1
AGEs	productos finales de glicación avanzada
Akt	proteína cinasa B
ATP	adenosín trifosfato
eIF3-f	subunidad F de factor de iniciación de la traducción eucariota 3
Epi	(-)-epicatequina
FOXO	factor de transcripción Forkhead O1
GLUT4	transportador de glucosa 4
GMEB-1	proteína 1 de unión al elemento modulador de glucocorticoides
HFD	dieta alta en grasas
HOMA-IR	modelo de evaluación de la homeostasis
IMC	Índice de masa corporal
IFN- γ	interferón gamma
IGF1	factor de crecimiento insulínico tipo 1
IGF1R	receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1
IKK	I κ B quinasa
IL-1	interleucina 1
IL-6	interleucina 6
iNOS	óxido nítrico sintasa inducible

IRS1	sustrato del receptor de insulina 1
I κ B	inhibidor de κ B
KO	knock out
LPS	lipopolisacárido
MAFbx	ubiquitina ligasa muscular E3 con caja F
MAPK	proteína quinasa activada por mitógeno
MCP-1	proteína quimioatrayente de monocitos 1
MEF2	factor potenciador de miocitos-2
MHC	cadena pesada de miosina
MRF4	factor regulador miogénico 4
MRFs	factores reguladores miogénicos
mTOR	diana de rapamicina en células de mamífero
MURF1	ubiquitina ligasa muscular E3 con dominio de dedos de zinc RING
Myf5	factor miogénico 5
MyoD	proteína 1 de diferenciación miogénica
NF- κ B	factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
p38	quinasa de proteínas activadas por mitógenos
p70S6K	proteína cinasa ribosómica S6 beta-1
Pax7	proteína de caja pareada 7
PCR	proteína C reactiva
PI3K	fosfoinositol 3-cinasa
PIP3	fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato

RAGE	receptor para los productos finales de glicación avanzada
RAPTOR	proteína reguladora asociada a mTOR
RICTOR	proteína insensible a la rapamicina de mTOR
RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SREMs	metabolitos estructuralmente relacionados con la (-)-epicatequina
STAT3	transductor de señal y activador de la transcripción 3
TNF-R1	receptor del factor de necrosis tumoral 1
TNF α	factor de necrosis tumoral alpha
TORC1	complejo sensible a rapamicina
TORC2	complejo insensible a rapamicina

1. RESUMEN

La obesidad por dieta alta en grasas, así como por programación, puede conducir a la desregulación del músculo esquelético con un posterior desarrollo de atrofia muscular, en el cual aumentan los procesos catabólicos y disminuyen los procesos anabólicos para la generación de nuevas proteínas musculares, ocasionando una disminución en la tasa de reparación del músculo, así como pérdida de función y cambios en su morfología. De tal forma, que el objetivo del presente estudio es analizar el efecto en la expresión de genes y proteínas relacionadas con la síntesis y degradación de proteínas del músculo esquelético, en un modelo animal de progenie de madres con dieta obesogénica; así como el efecto de una dieta posnatal alta en grasas y la administración del flavonoide –(-) epicatequina (Epi).

Se desarrolló un modelo experimental en ratas macho Wistar (F1), provenientes de madres control o alimentadas con dieta alta en grasas (F0), las cuales, posterior al destete, fueron alimentadas con dieta control o dieta alta en grasas hasta el día 110 posnatal. De igual manera se evaluó la administración en la etapa posnatal de la Epi durante 90 días, desde el destete hasta el fin del estudio (1 mg/kg/12 h). Como tejido de estudio se evaluó el músculo esquelético gastrocnemio y sóleo.

Se demostró que la administración de Epi por 90 días induce una disminución en la expresión transcripcional de *Murf1* ($p = 0.036$) y *NF- κ B* ($p = 0.038$) en músculo gastrocnemio. Por otra parte, a nivel de expresión proteica se demostró que el consumo de una dieta materna alta en grasas induce una disminución del marcador de diferenciación muscular MyoD en músculo gastrocnemio ($p = 0.0061$), mientras que una dieta posnatal alta en grasas induce un aumento en la expresión de MURF en músculo gastrocnemio ($p < 0.0001$), así como un aumento de MAFbx en músculo gastrocnemio ($p = 0.01$) y sóleo ($p = 0.0475$), ambas proteínas inductoras de atrofia muscular. No se presentaron cambios en la fosforilación del factor de transcripción NF- κ B, ni en la fosforilación de la cinasa inductora de hipertrofia muscular p70S6K- α .

Como conclusión, la administración del flavonoide Epi induce una disminución transcripcional en los inductores de atrofia muscular *Murf1* y *NF-κB* en músculo gastrocnemio. Por otra parte, la obesidad materna ocasiona una disminución a nivel de proteína del factor de diferenciación muscular MyoD; mientras que la dieta alta en grasas en la vida posnatal induce un aumento significativo de la expresión del MURF y MAFbx, moléculas relacionadas con la degradación de tejido musculoesquelético en músculo gastrocnemio y sóleo. De manera interesante, las variables estudiadas no tienen influencia sobre la expresión de p70S6K-α, molécula involucrada con la hipertrofia del tejido muscular.

2. ABSTRACT

Obesity due to a high-fat diet, as well as by programming, can lead to the deregulation of skeletal muscle, with a subsequent development of muscle atrophy, in which catabolic processes increase and anabolic processes decrease for the generation of new muscle proteins, causing a decrease in the rate of muscle repair, as well as loss of function and changes in its morphology. The aim of this study was to evaluate the effect on the expression of genes and proteins related to the synthesis and degradation of skeletal muscle proteins, in an animal model of progeny of mothers with an obesogenic diet; as well as the effect of a high-fat postnatal diet and the administration of the flavonoid (-)-epicatechin (Epi).

An experimental model was developed in male Wistar rats (F1), from control or obese mothers (F0), which, after weaning, were fed with a control or high-fat diet until postnatal day 110. Likewise, the administration of Epi for 90 days in the postnatal stage was evaluated from weaning to the end of the study (1 mg/kg/ 12 h). The gastrocnemius and soleus skeletal muscles were evaluated.

It was demonstrated that the administration of Epi for 90 days induces a decrease in the transcriptional expression of *Murf1* ($p = 0.036$) and *NFκB* ($p = 0.038$) in gastrocnemius muscle. On the other hand, at the level of protein expression, it was shown that the presence of a maternal high-fat diet induces a decrease in the muscle differentiation marker MyoD in gastrocnemius muscle ($p = 0.0061$), while a postnatal high-fat diet induces significant increase in MURF expression in gastrocnemius muscle ($p < 0.0001$), as well as an increase in MAFbx in gastrocnemius ($p = 0.01$) and soleus muscle ($p = 0.0475$), both proteins induce muscle atrophy. There were no changes in the phosphorylation of the transcription factor NFκB, nor in the phosphorylation of the kinase p70S6K- α which induced muscle hypertrophy.

In conclusion, the administration of the flavonoid Epi induces a transcriptional decrease in the muscle atrophy inducers *Murf1* and *NF-κB* in the gastrocnemius muscle. On the other hand, maternal obesity causes a decrease in the protein level of the muscle differentiation factor MyoD; while the high-fat diet in postnatal life induces a significant increase in the expression of MURF and MAFbx, molecules related to the degradation of musculoskeletal tissue in the gastrocnemius and soleus muscles. Interestingly, the variables studied have no influence on the expression of p70S6K-α, a molecule involved in muscle hypertrophy.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Obesidad

La obesidad es una enfermedad multifactorial caracterizada por un aumento en el número y/o tamaño de los adipocitos y actualmente es uno de los mayores problemas de los sistemas de sanidad pública del siglo XXI (Choe et al., 2016; Qasim et al., 2018). La Organización Mundial de la Salud (OMS), ha definido a la obesidad como una acumulación excesiva de tejido adiposo que perjudica la salud del individuo, y es diagnosticada con un IMC superior o igual a 30 kg/m². Además de la morbilidad intrínseca a la patología, la obesidad, aumenta el riesgo de presentar otras enfermedades como diabetes tipo II, esteatosis hepática, osteoartritis, apnea obstructiva del sueño, además de un importante aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular y una disminución en la esperanza de vida (Choe et al., 2016; Goossense 2017; Blüher 2019). A nivel molecular, la obesidad también involucra cambios en el microambiente del tejido adiposo, caracterizados por alteraciones en la secreción de adipocinas, apoptosis de adipocitos, hipoxia local y acumulación de ácidos grasos. También se acompaña de alteraciones en otros procesos como la adipogénesis, la angiogénesis y la respuesta inmune en el tejido (Choe et al., 2016; Goossense 2017).

En México, en las últimas 3 décadas se ha presentado un incremento abrupto en la prevalencia de sobrepeso y obesidad, posicionándose como la problemática nutricional más prevalente en nuestra población. De acuerdo con datos de la encuesta ENSANUT 2021 sobre Covid-19, la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad en la población de 5 a 11 años se sitúa en 37.4% (Fig. 1. Comparativo de la prevalencia nacional de sobrepeso y obesidad en población de 5 a 11 años de edad, de la ENN-1999 y Ensanut 2006, 2012, 2018-19, 2020 y 2021, por sexo (tomado de Shamah-Levy et al., 2022).); esto habla de una importante proporción de infantes con esta patología; mientras que, los adolescentes de entre 12 y 19 años tienen una prevalencia combinada de obesidad

y sobrepeso de 42.9%. Finalmente, para adultos de 20 años y más, el porcentaje de sobrepeso y obesidad es del 72.4%; de manera interesante, al analizar únicamente a la población femenina, se observa una prevalencia más alta de sobrepeso y de obesidad, alcanzando el 75.0%, (Fig. 2) (Shamah-Levy et al., 2022).

Resulta de interés mencionar que, al observar las estadísticas en la población de mujeres en edad reproductiva, 20 a 49 años de edad, se observa una importante prevalencia de sobrepeso y obesidad, alcanzando el 71.8% (Fig. 3), siendo el 39% la prevalencia de obesidad. Estos datos muestran que gran proporción de la población femenina en etapa reproductiva podría mantener estas condiciones metabólicamente adversas durante el embarazo, condicionando la exposición a este ambiente obesogénico *in útero* a los futuros infantes (Shamah-Levy et al., 2022).

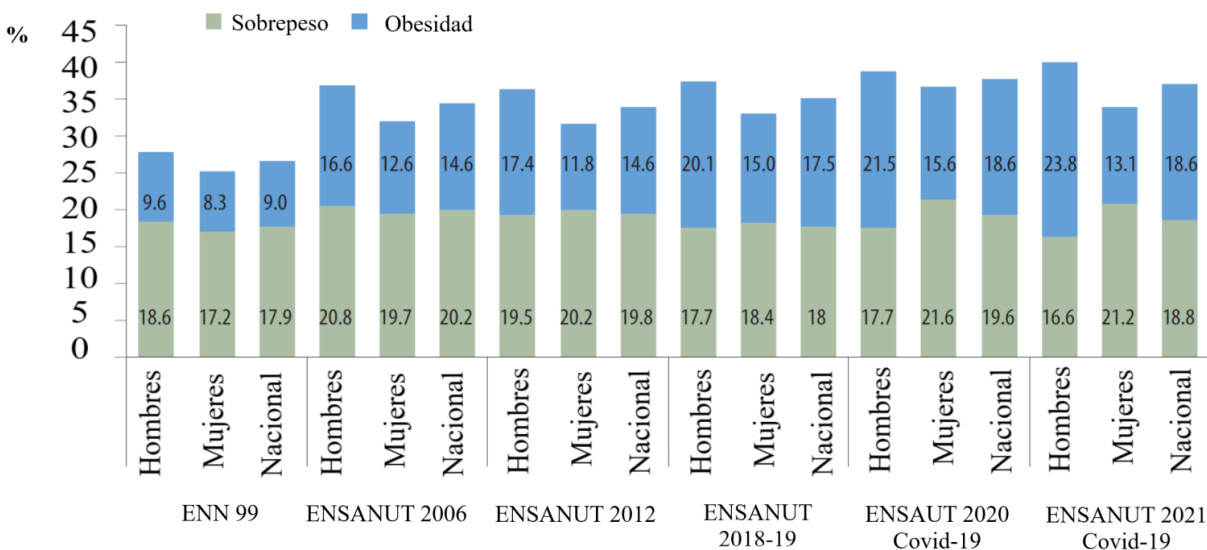


Fig. 1. Comparativo de la prevalencia nacional de sobrepeso y obesidad en población de 5 a 11 años de edad, de la ENN-1999 y Ensanut 2006, 2012, 2018-19, 2020 y 2021, por sexo (tomado de Shamah-Levy et al., 2022).

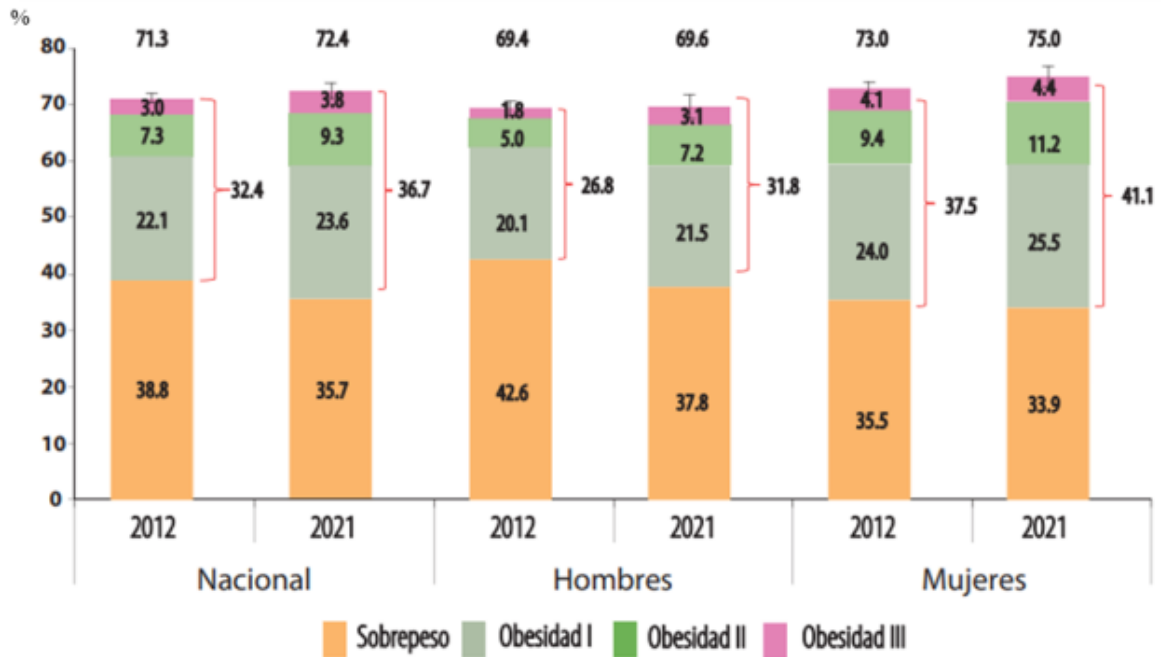


Fig. 2. Comparación de las categorías de IMC en hombres y mujeres con 20 años o más de edad Ensanut 2012 y 2021. (tomado de Shamah-Levy et al., 2022).

Entre corchetes se muestra el porcentaje acumulado de sobrepeso, obesidad I, obesidad II y obesidad III.

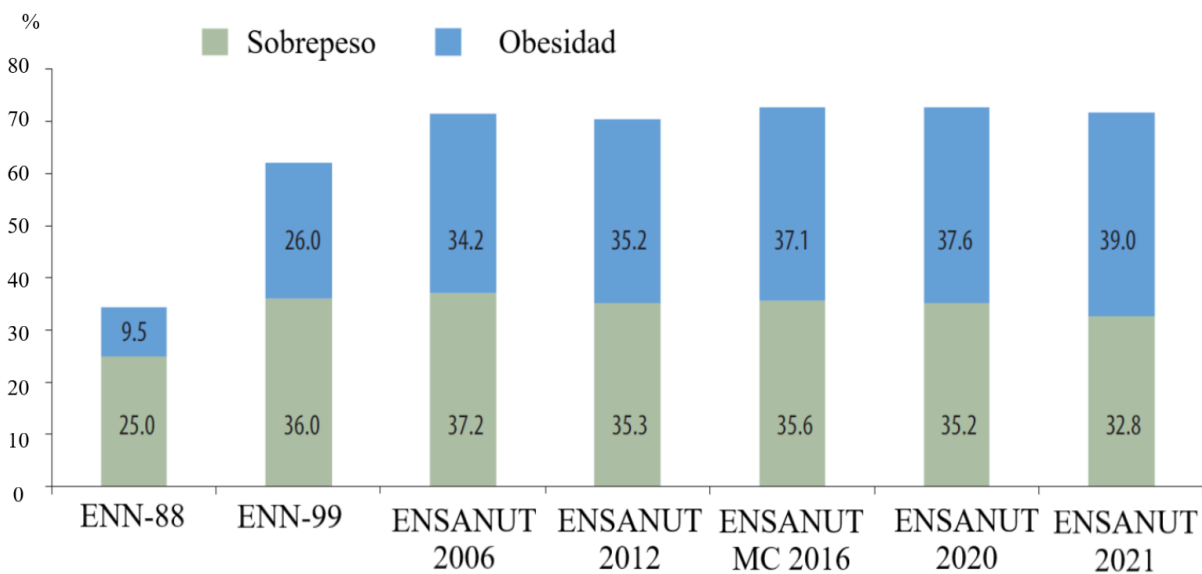


Fig. 3. Comparación de las prevalencias de sobrepeso y obesidad en mujeres de 20 a 49 años de edad, participantes en la ENN 88, ENN 99, Ensanut 2006, 2012, 2020 y 2021 (tomado de Shamah-Levy et al., 2022).

3.2. Obesidad materna y programación fetal

Las estadísticas de obesidad y sobrepeso en mujeres en edad reproductiva posicionan a la obesidad materna como una problemática de salud antes y durante el periodo de gestación; de manera paralela, también se ha determinado que esta condición patológica podría tener efectos deletéreos sobre el desarrollo del producto. Estudios realizados en Estados Unidos de América han descritos que más del 60% de mujeres en edad reproductiva tienen sobrepeso y cerca del 30% tiene obesidad, al momento de la concepción (Flegal et al., 2012; Driscoll y Gregory, 2020); de igual manera, como se ha mencionado previamente, las cifras para México reportadas por ENSANUT 2021, describen una alta prevalencia de sobrepeso y obesidad en mujeres en edad reproductiva, alcanzando 71.8% (Shamah-Levy et al., 2022). Estos datos sugieren que, una importante población mexicana de infantes habrá estado expuesta a un ambiente obesogénico *in útero* durante periodos claves del desarrollo prenatal, con potenciales riesgos asociados para la vida posnatal (King 2006; Neri y Edlow, 2016; Zambrano et al., 2016).

Diversos estudios epidemiológicos han sostenido que la salud materna y el estado nutricional durante el embarazo y la lactancia tienen efectos sobre la salud del producto de la gestación, encontrando cierta relación entre la obesidad materna y un aumento en el índice de adiposidad y peso corporal de la progeñe, además de un aumento en el riesgo de presentar síndrome metabólico, obesidad y alteraciones en el metabolismo de la glucosa en la vida adulta (Boney et al., 2005; Sewell et al., 2006; Yu et al., 2013). El ambiente *in útero* parece tener un importante papel en la programación de diversos aspectos de la fisiología y el comportamiento de la progeñe en cuanto a la programación de circuitos neurales que de manera subsecuente influyen en el metabolismo y la

regulación del balance energético, ejerciendo una influencia sostenida en la fisiología adulta (Sullivan et al., 2011). De manera interesante, se han caracterizado alteraciones en las vías de las melanocortinas, las vías serotoninérgicas y dopaminérgicas que influyen en el apetito y pueden relacionarse con una predisposición a la hiperfagia y la preferencia de alimentos altos en grasas e y carbohidratos durante la vida adulta (Sullivan et al., 2011)

Además de las asociaciones epidemiológicas, la influencia de la obesidad materna sobre la fisiología de la progenie se ha descrito en diversos modelos animales, en los cuales se han informado un aumento del peso corporal y acumulación de tejido adiposo en la progenie de madres con obesidad (Guo y Jen, 1995; Levine y Govek, 1998; Samuelsson et al., 2008; George et al., 2010; Zambrano et al., 2010), fenómenos de resistencia a la leptina y a la insulina (Levine y Govek, 1998; Férézou-Viala et al., 2007; Samuelsson et al., 2008; Catalano et al., 2009; Zambrano et al., 2010; Fan et al., 2013), hipertensión (Samuelsson et al., 2008), dislipidemias (Bouanane et al., 2010; Zambrano et al., 2010), alteraciones del tejido hepático caracterizadas por inflamación, aumento en los niveles de estrés oxidativo y sobrerregulación de enzimas hepáticas gluconeogénicas (Guo y Jen, 1995; McCurdy et al., 2009; Bayol et al., 2010; Bouanane et al., 2010); estas alteraciones se manifiestan desde etapas tempranas del desarrollo posnatal, hasta la vida adulta. De manera interesante, se ha descrito que algunos de estos efectos son hasta cierto grado irreversibles, pues no son completamente abolidos por dietas adecuadas posnatales (Neri y Edlow, 2016).

En la actualidad se habla de un término denominado “impronta metabólica”, que se refiere a la programación de las respuestas metabólicas futuras en los individuos como consecuencia de estímulos ocurridos durante un periodo de desarrollo crítico. Si se analiza desde un punto de vista evolutivo, esta impronta metabólica tiene el propósito de potencializar la supervivencia de la progenie al programar la regulación del balance de energía de tal manera que las fuentes energéticas disponibles pueden ser utilizadas de la manera más eficiente. Consecuencia de este fenómeno, los

sistemas fetales que parecen ser más sensible a la programación fetal son el sistema nervioso central y el sistema cardiometabólico (Sullivan et al., 2011).

Los mecanismos potenciales de la programación fetal inducida por una dieta alta en grasas incluyen la presencia de factores circulantes como la leptina o la insulina; la exposición a sustratos energéticos como la glucosa, los ácidos grasos libres y triacilglicéridos los cuales se encuentran elevados al igual que ciertas citocinas proinflamatorias (Ramsay et al., 2002; Stewart et al., 2007; Grayson et al., 2010; Lappas, 2014). Esta exposición podría condicionar la generación de modificaciones epigenéticas, incluyendo metilación del ADN, modificaciones de histonas de manera postraducciona y variaciones de microARNs (Ross y Desai, 2013; Neri y Edlow, 2016); de igual manera se ha postulado que la exposición a estos elementos durante el desarrollo fetal podría estar relacionado con una disrupción en los circuitos de regulación neurales relacionados con el control del apetito (Chang et al., 2008; Walker et al., 2008; Grayson et al., 2010).

Río debajo de estas modificaciones epigenéticas, se han examinado los transcriptomas de diversos tejidos en modelos de obesidad en madres e hijos. Por ejemplo, al analizar el perfil transcripcional del tejido adiposo en la proge de un modelo murino de obesidad materna, se mostraron cambios significativos en la expresión de genes involucrados con vías de señalización lipogénicas, lo que sugiere una mayor propensión a la adipogénesis en la proge (Borengasser et al., 2013), la cual se ha evidenciado en otros trabajos, al mostrar un mayor índice de adiposidad en los hijos de madres obesas, aumento en los transportadores de sustratos energéticos hacia los adipocitos, así como mayor biosíntesis de ácidos grasos (Long et al., 2012; Ross y Desai, 2013; Desai et al., 2014).

También se han utilizado técnicas de ARN-Seq para examinar el tejido de músculo esquelético en ratones expuestos a un ambiente obesogénico *in útero*, encontrando un incremento en la activación de citocinas, inflamación y disfunción mitocondrial comparados con los controles. En otros estudios se han encontrado alteraciones en la expresión del receptor de insulina en el músculo

esquelético de la progenie de madres obesas, así como una disminución relativa de la masa muscular (Samuelsson et al., 2008; Yan et al., 2013; Latouche et al., 2014; Neri y Edlow, 2016). En referencia a otros tejidos, se ha sugerido que el hígado fetal es una diana importante en la programación metabólica durante el desarrollo fetal, incrementando la expresión de genes hepáticos lipogénicos, ocasionando una reducción en la función mitocondrial y desregulación en la expresión de genes inflamatorios y aquéllos involucrados en la glucólisis, gluconeogénesis y estrés oxidativo (McCurdy et al., 2009; Bayol et al., 2010; Bouanane et al., 2010). De igual manera, otros tejidos aparecen afectados en esta impronta metabólica, se ha mostrado una desregulación en la expresión de genes de las células pancreáticas productoras de insulina, y alteraciones en la estructura trabecular de huesos, así como cambios epigenéticos en la expresión de genes de adipocinas. Incluso se ha encontrado evidencia de un incremento en la expresión de transportadores de glucosa y aminoácidos en la placenta de madres obesas (Buckley et al., 2005; Neri y Edlow, 2016).

3.3. Obesidad y atrofia muscular

Tanto en modelos de obesidad en la adultez, como en modelos novedosos de obesidad materna, se ha determinado que uno de los tejidos afectados por este estado patológico es el músculo esquelético. Evidencia reciente ha mostrado que las complicaciones metabólicas derivadas de una dieta alta en grasas también traen por consecuencia un aumento en el riesgo de complicaciones músculoesqueléticas como obesidad sarcopénica, osteoporosis, tendinopatías y osteoartritis (Wearing et al., 2006; Collins et al., 2018); y en términos generales, se ha descrito ampliamente que la obesidad puede asociarse a cierto grado de atrofia muscular, presentando un cuadro caracterizado por una elevada masa grasa a expensas de una baja masa muscular. Como manifestaciones clínicas, puede tener aparejada una disminución de la fuerza y de la función

muscular, lo que es un importante factor de riesgo para la salud, dado que disminuye la movilidad, aumenta el riesgo de caídas y por ende causa de fracturas óseas; disminuye la capacidad de hacer las labores diarias habituales, conduce a la pérdida de la vida independiente y aumenta el riesgo de muerte (Lee et al., 2017).

Se han analizado las relaciones moleculares entre la obesidad y la disfunción metabólica del músculo esquelético, encontrando que, secundario a una dieta alta en grasas, éste tejido se ve afectado, mostrando un aumento en la fibrosis del tejido, una deposición lipídica ectópica, así como un proceso de inflamación caracterizado por una infiltración de células proinflamatorias y expresión de marcadores inflamatorios en células musculares (Fink et al., 2014; Collins et al., 2017). De manera concomitante, este proceso de inflamación tisular se acompaña de una disminución en la sensibilidad a la insulina y una deposición de tejido adiposo ectópico; así como un aumento en los marcadores de degradación muscular (Akhmedov y Berdeaux, 2013; Fink et al., 2014; Collins et al., 2016). Además de la función intrínseca del músculo esquelético, la capacidad de diferenciación celular y regeneración tisular también parece verse afectada por una dieta alta en grasas (D'Souza et al., 2015).

Comenzando con el papel del sistema inmune, el fenómeno de la obesidad se caracteriza por ser un estado de inflamación crónica de bajo grado, por lo que las afectaciones a tejidos distantes podrían verse explicadas, en parte, por un ambiente proinflamatorio constante. Se han descrito diversos mediadores inflamatorios en el músculo esquelético en el contexto de obesidad como NF- κ B, que puede verse elevado en presencia de TNF α , citocina que se encuentra elevada en modelos animales de obesidad y diabetes. La exposición exógena a citocinas proinflamatorias o niveles endógenos de citocinas está asociada con daño en el tejido músculoesquelético (Akhmedov y Berdeaux, 2013), y se ha estudiado que estos niveles elevados citocinas como TNF α y IL-6, poseen efectos catabólicos en el tejido (Wu y Ballantyne, 2017; Collins et al., 2018). No sólo se ha

caracterizado la elevación de citocinas proinflamatorias en el contexto de daño muscular en la obesidad, sino que, además, se han descrito fenómenos de polarización de células inflamatorias hacia un fenotipo proinflamatorio. Diversos estudios han descrito la presencia de macrófagos M1 en músculo esquelético en el contexto de obesidad, tanto en modelos animales como en humanos (Fink et al., 2014; Khan et al., 2015; Collins et al., 2016). En el contexto de la obesidad, los macrófagos pueden sufrir un proceso de polarización hacia M1 secundario a la exposición a citocinas proinflamatorias como IL6, TNF α o incluso la exposición a productos de glicación avanzados (AGEs, por sus siglas en inglés) (Castoldi et al., 2015; Jin et al., 2015; Braune et al., 2017).

Además, se sabe que las adipocinas secretadas por los adipocitos tienen efectos sobre los tejidos sensibles a insulina, especialmente el hígado y el músculo esquelético. Por ejemplo, la leptina, hormona que regula el apetito, el gasto energético y la homeostasis de la glucosa, se encuentra elevada en el contexto de la obesidad, y se ha demostrado que niveles elevados, están asociados con daño al tejido músculoesquelético, además de inducir la activación de vías de señalización proinflamatorias (Lord et al., 1998; Collins et al., 2015). En cuanto a la diferenciación de músculo esquelético, es interesante notar que la señalización de leptina parece ser necesaria para la activación de las células satélite. La leptina tiene la capacidad de estimular la proliferación y activación de los macrófagos, regula al alza la miostatina, la cual regula de manera negativa la hipertrofia muscular. Además del aumento de leptina por parte del tejido adiposo, también se ha descrito que la elevación en sus concentraciones puede ser secundario a la presencia de TNF α , IL-1 y LPS plasmáticas, lo que crea un circuito de retroalimentación positiva que exacerba las complicaciones al músculo esquelético inducidas por obesidad.

Otra adipocina relevante es la adiponectina, cuyos niveles tienen una relación proporcionalmente negativa con la grasa corporal (Ajuwon y Spurlock, 2005), en el músculo, la adiponectina aumenta la oxidación de ácidos grasos, la captación de glucosa y atenúa la inflamación local.

Además de las citocinas proinflamatorias y las adipocinas, otros elementos presentes en el cuadro de obesidad que podrían causar un fenómeno de atrofia muscular son los AGEs, los cuales se acumulan por el exceso en la disponibilidad de glucosa y el fenómeno de hiperglicemia que usualmente acompaña a la obesidad. Estas moléculas pueden interferir con el proceso de regeneración muscular y disminuir la función de contractibilidad muscular, al demostrarse que una dieta rica en estos productos conduce a una disminución de la fuerza muscular, pérdida de masa, disminución de factores de transcripción miogénicos, así como disminución en la señalización muscular inductora de la síntesis proteica (Egawa et al., 2017). De manera mecánica, los AGEs podrían activar al receptor RAGE de los macrófagos, induciendo una respuesta proinflamatoria, así como generar alteraciones en la trama de la matriz extracelular, afectando las propiedades mecánicas y biológicas del músculo esquelético (Leuner et al., 2012; Abate et al., 2013; Jin et al., 2015).

Otro fenómeno que contribuye a la desregulación metabólica es la deposición ectópica de grasa en músculo esquelético. Histológicamente, este tejido adiposo puede localizarse entre los miocitos como tejido adiposo intermiocelular/intermuscular o rodeando el músculo como tejido adiposo perimuscul. Ambas localizaciones se consideran grasa extramiocelular que se expande de manera sustancial en la obesidad y disminuye tras la pérdida de peso. Es en estos depósitos ectópicos de grasa en donde ocurre la infiltración, acumulación y activación de macrófagos y linfocitos T, que lleva a la secreción de múltiples citocinas proinflamatorias como $\text{TNF}\alpha$, IL-1 e IFN- γ en el mismo sitio. Además, estos depósitos se han correlacionado fuertemente con resistencia a la insulina y expresión de MCP-1 y proteína C reactiva (Khan et al., 2015) (Fig. 4).

Como se ha mencionado anteriormente, la obesidad también puede conducir a una regeneración muscular disminuida, como ha sido demostrado por Brown y colaboradores (2015), en cuyo proyecto se describe que tras un daño muscular, los animales con obesidad tienen una disminución en los niveles de IL-6, MyoD e IGF1 en comparación con controles sin obesidad, los cuales a su vez, parecen tener las cascadas de señalización de Akt y STAT3 activadas, en comparación de los ratones con exceso de tejido adiposo (Brown et al., 2015). Se han propuesto algunos factores contribuyentes a este fenómeno de reducción en la capacidad de regeneración muscular como la elevación de metabolitos lipídicos secundaria a una función mitocondrial deficiente, además de una elevación de citocinas proinflamatorias como TNF α , el cual tiene efectos contrarios a IGF1 (Akhmedov y Berdeaux, 2013). La disminución de IGF1, resulta en una disminución de la cascada de señalización de PI3K-Akt-mTOR, lo que a su vez lleva a una disminución en la síntesis proteica (Akhmedov y Berdeaux, 2013; Brown et al., 2015). Finalmente, también se ha descrito que la obesidad lleva a un aumento en los niveles de miostatina, un fenómeno que podría explicar la disminución en la capacidad de regeneración tisular (Karalaki et al., 2009).

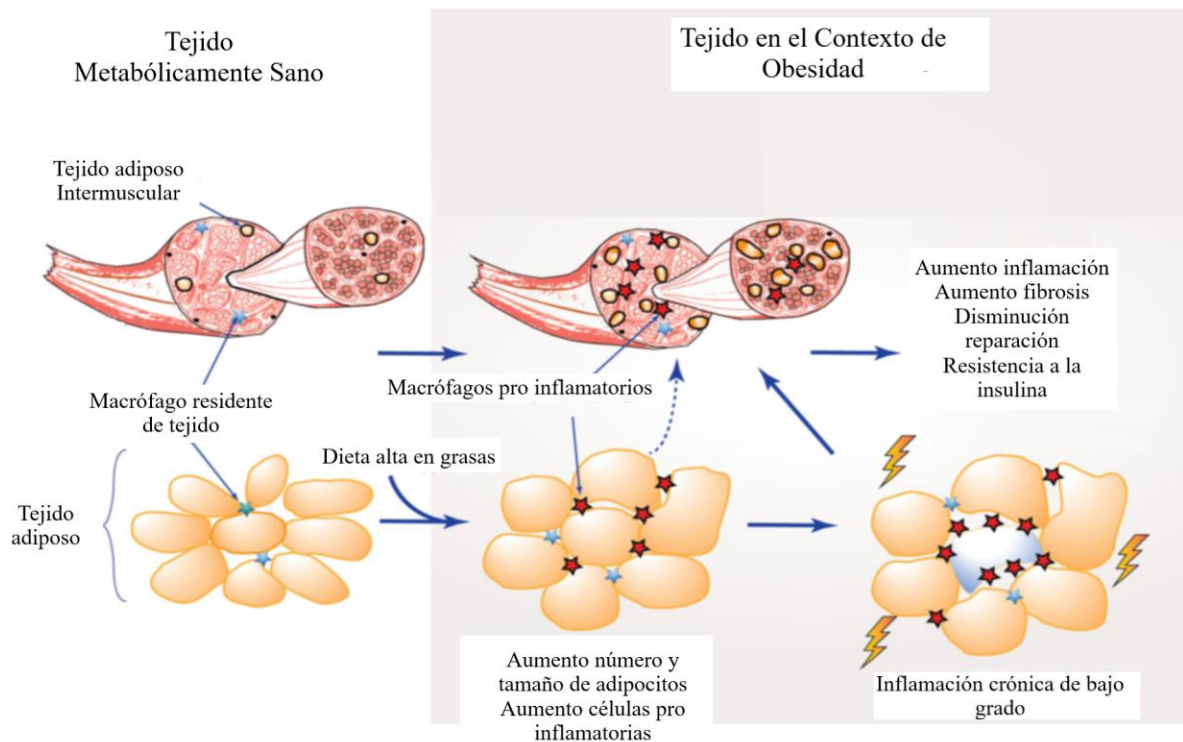


Fig. 4. Cambios estructurales e inflamatorios en el músculo en el contexto de la obesidad. Alteraciones en el tejido adiposo secundarios a la obesidad y consecuencias musculoesqueléticas de la inflamación leve y crónica sobre el tejido musculoesquelético (tomado de Khan et al., 2015).

Finalmente, también se han descrito fenómenos de aumento del estrés oxidativo en el contexto de obesidad, con la capacidad de afectar al músculo esquelético. La disfunción mitocondrial es parte de las consecuencias de la obesidad, y es atribuible al aumento en la necesidad de procesar nutrientes, lo que resulta en el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y disminución en la síntesis de ATP (Weiss et al., 2013). Secundario a la disfunción mitocondrial se genera aumento del estrés oxidativo y acumulación de especies reactivas de oxígeno, lo que puede conducir al inicio de las disfunciones metabólicas (Serra et al., 2013), siendo que la acumulación de radicales libres puede conducir a la peroxidación de lípidos y disrupción de la membrana celular, desnaturalización de proteínas, disminución en la síntesis de proteínas e incluso apoptosis celular; este fenómeno se

observa en varios tejidos, incluyendo el músculo esquelético. Por otra parte, el aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno puede resultar en susceptibilidad a la fatiga muscular y disfunción contráctil el músculo esquelético; así como una reducción en la capacidad de regeneración tisular (Powers et al., 2011; Kozakowska et al., 2015).

Si bien se ha descrito ampliamente la relación que tiene la obesidad por dieta alta en grasas con el daño a músculo esquelético, poco se sabe acerca del efecto que puede tener la programación fetal inducida por una dieta materna alta en grasas, aunado a un estímulo de dieta alta en grasas en la vida posnatal. Ciertos grupos de investigación han demostraron en un modelo de obesidad materna inducida por dieta alta en grasas en ratas, que la progenie de madres con obesidad más una dieta posnatal alta en grasas tenía un mayor peso corporal que las ratas provenientes de madres control y alimentadas con dieta alta en grasas en la vida posnatal únicamente (Parente et al., 2008; Li et al., 2017; Hsu et al., 2020); igualmente este doble estímulo ocasionaba una mayor tasa de ganancia de peso (Hsu et al., 2020). Estos resultados demuestran que la programación fetal inducida por obesidad materna podría predisponer a la progenie a un aumento de peso corporal más pronunciado al enfrentarse a un reto de dieta alta en grasas en la vida posnatal. También se ha demostrado un aumento en el porcentaje de tejido adiposo retroperitoneal y epididimal en los animales con doble estímulo (Glastras et al., 2017), así como un aumento en el área de los adipocitos (Parente et al., 2008), indicando que la dieta alta en grasas potencializa los efectos del antecedente de obesidad materna.

Por otra parte, se ha demostrado una interacción entre la obesidad materna y la dieta alta en grasas en la vida posnatal en cuanto al metabolismo de carbohidratos, al describir un aumento significativo en la glucosa sérica en ayuno y tras una prueba de tolerancia a la glucosa en los animales con doble estímulo en comparación de aquellos con un solo estímulo, ya sea antecedente de obesidad materna o dieta alta en grasas posnatal (Parente et al., 2008; Li et al., 2017; Glastras et al., 2017; Hsu et al.,

2020), indicando que la exposición previa a un ambiente obesogénico *in útero*, acompañado de una dieta posnatal alta en grasas, induce cierto grado de resistencia a la insulina. En otros parámetros metabólicos, también se ha demostrado una interacción entre la obesidad materna y la dieta alta en grasas posnatal, en el aumento de las cifras de tensión arterial (Parente et al., 2008), y un aumento en los niveles de colesterol plasmático (Tain et al., 2017a). Lo que no se ha descrito hasta ahora, es si la adición de estos dos estímulos deletéreos puede inducir alteraciones en otros tejidos involucrados con el metabolismo energético, como lo es el músculo esquelético, y si éstas pueden ser de mayor magnitud que aquellas inducidas por la presencia de un sólo estímulo.

3.4. Atrofia muscular

El músculo esquelético es un tejido con alta plasticidad, que sufre procesos de remodelación constantes y es responsable de la mayor parte de la captación de la glucosa a nivel sistémico. La composición del músculo esquelético es heterogénea y se divide a grandes rasgos en fibras de tipo I (contracción lenta/oxidativa) y fibras de tipo II (contracción rápida/glucolítica), las cuales difieren en su distribución, propiedades contráctiles y vías metabólicas preferencialmente utilizadas: Las fibras de tipo II se dividen en fibras IIA, IIB y IIX, y se ha descrito que esta categorización depende del patrón de expresión de las isoformas de las cadenas pesadas de miosina (Rubinstein y Kelly, 2004; Schiaffino y Reggiani, 2011; Mukund y Subramaniam, 2019). Histológicamente, las fibras de tipo I están altamente vascularizadas y contienen mitocondrias y mioglobina en abundancia, exhiben poca actividad glucolítica, son más resistentes a la fatiga y pueden contraerse durante periodos largos de tiempo. Por otra parte, las fibras de tipo II poseen un tiempo de contracción rápida con actividad anaeróbica en ráfaga; sin embargo, los tres subtipos de fibras de tipo II varían tanto en velocidad contráctil como en generación de fuerza, siendo las fibras IIA más similares a

las de contracción lenta, pues poseen abundante mioglobina y dependen más del metabolismo oxidativo (Mukund y Subramaniam, 2019).

De igual manera, las fibras de contracción lenta y rápida, difieren en su cinética de calcio y actividad de contracción; las fibras de tipo II tienen una contracción rápida del sarcómero gracias a la generación rápida y transitoria de pulsos de Ca^{2+} y poseen una poderosa maquinaria contráctil gracias a las diferentes isoformas de miosina (MHC2 en las fibras IIA, MHC4 en las IIB y MHC1 en las fibras IIX, respectivamente) que permite una rápida velocidad de acortamiento sarcomérica y una mayor potencia mecánica. Las fibras lentas se contraen mucho más lentamente, generando menos potencia mecánica con un menor gasto de ATP (Reggiani y Te Kronnie, 2006; Mukund y Subramaniam, 2019).

Dadas las diferencias metabólicas entre los tipos de fibras musculares, la distribución de los tipos de fibras dentro de los grupos musculares puede variar por factores ambientales, como la actividad física y la dieta; y por factores biológicos, como la edad y la genética (Mukund y Subramaniam, 2019; Damer et al., 2022). De manera específica para el caso de la obesidad, se ha estudiado que los individuos con obesidad tienen una mayor proporción de fibras musculares rápidas/glucolíticas, a comparación de los individuos con peso normal (Damer et al., 2022). De manera particular, Zhang y colaboradores (2024), describieron que la obesidad causa una disminución en la proporción de fibras oxidativas; y de manera interesante, también describieron que en músculos predominantemente glucolíticos, la obesidad causa un aumento en genes involucrados con el proceso de atrofia muscular e inflamación, no así en tejido muscular predominantemente oxidativo, indicando la vulnerabilidad de las fibras glucolíticas a los efectos deletéreos de la obesidad (Zhang et al., 2024).

Ciertas evidencias que muestran el efecto adverso de la obesidad sobre el tejido muscular proponen un modelo de desregulación del músculo esquelético con un posterior desarrollo de atrofia

muscular, en el cual aumentan los procesos catabólicos y disminuyen los procesos anabólicos para la generación de nuevas proteínas musculares, ocasionando una disminución en la tasa de reparación del músculo, así como pérdida de función y cambios en su morfología. También se ha mostrado que, en estos procesos de atrofia muscular asociado a alteraciones metabólicas y condiciones inflamatorias, destacan un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno, daño mitocondrial y la generación de un ambiente proinflamatorio muscular, en el cual se observa un incremento de diversas citocinas proinflamatorias, capaces de desencadenar cascadas de señalización específicas (Johnson et al., 2013; Schiaffino et al., 2013).

Se ha descrito que la masa muscular es dependiente del balance de los estímulos anabólicos y los estímulos catabólicos en el tejido. La vía de señalización mediada por PI3K-Akt se ha mostrado como pieza clave en la regulación de los estímulos anabólicos, mientras que las cascadas de señalización inducidas por citocinas proinflamatorias se han posicionado como aquéllas involucradas en la degradación de proteínas musculares (Sishi et al., 2011).

La vía de señalización medida por PI3K-Akt comienza con el factor de crecimiento IGF1 (Fig. 5), el cual ha sido descrito como un agente inductor de la hipertrofia muscular, incrementando la masa muscular a través de la estimulación de esta vía y la subsecuente activación de múltiples proteínas requeridas para la síntesis de proteínas musculares, induciendo un aumento en el tamaño del miotubo (Adams y McCue, 1998; Bark et al., 1998; Pelosi et al., 2007). Además, parece poseer otras funciones de activación enzimática y aumento de los productos de la glucólisis anaerobia (Bark et al., 1998). Como factor de crecimiento, estimula tanto la proliferación como la diferenciación de células musculares (Engert et al., 1996; Florini et al., 1996) e induce la proliferación de las células satélite (Chakravarthy y Booth, 2000) así como la diferenciación de las mismas por inducción de la expresión de miogenina (Florini et al; 1996; Philippou et al., 2007).

La señalización vía IGF1 es mediada por la unión de este ligando con su receptor IGF1R, lo que induce la transfosforilación del receptor dimérico, creando un sitio de unión fosforilado para el reclutamiento del sustrato del receptor de insulina 1 (IRS1). La activación de IRS1 mediante fosforilación es capaz de activar a PI3K que a su vez generará PIP3 con la subsecuente activación de Akt mediada por la fosforilación a cargo de PDK1 en su residuo T308; de igual manera Akt puede verse activada por TORC2 en un ciclo de retroalimentación positiva en la serina 473 (Ser473) (Egerman y Glass, 2014).

La activación de PI3K/Akt(Fig. 5) permite la activación de mTOR, quien existe en dos diferentes complejos: TORC1 asociada a su proteína reguladora RAPTOR, y TORC2 unida a la proteína RICTOR. TORC2 tiene la función de fosforilar a Akt en la serina 473 como parte de un ciclo de retroalimentación positivo como se ha mencionado anteriormente. TORC1 ejerce un efecto positivo sobre la generación de proteínas musculares a través de la activación de la cinasa de p70S6 (p70S6K), molécula necesaria para que las fibras musculares alcancen su tamaño normal. Este fenómeno ha sido descrito en modelos *in vivo*, en los cuales, la ausencia de este gen produce células musculares de menor tamaño (Bodine et al., 2001a; Glass 2005; Ohanna et al., 2005; Egerman y Glass, 2014).

Además de las vías antes descritas para Akt, también se ha encontrado que su activación induce la inhibición del factor de transcripción FOXO (Fig. 5) mediante su fosforilación, impidiendo su translocación al núcleo. Si FOXO se localiza en el núcleo, es capaz de sobreregular la transcripción de las ubiquitinas ligasas MURF1 y MAFbx. De manera específica se ha visto que la activación de FOXO1 o FOXO3 resulta en la inducción de atrofia muscular (Kamei et al., 2004; Sandri et al., 2004; Glass, 2005).

Durante el proceso de atrofia muscular, se observa una estimulación de la proteólisis, que se debe en gran medida a la activación de la vía ubiquitina-proteosoma. Esta vía de señalización marca

proteínas específicas para su degradación e involucra la acción de las ligasas de ubiquitina (E3), las cuales son los componentes que dan especificidad al sistema de degradación. De manera particular, hay dos proteínas ligasas de ubiquitina que se han mostrado involucradas en la degradación de proteínas miofibrilares, las cuales son MAFbx y MURF1 (Fig. 5). Se ha descrito que la expresión de MURF1 y MAFbx es estimulada cuando hay una denervación del músculo, ocasionando parálisis y atrofia muscular severa. También se ha encontrado una sobreexpresión de estos genes tras la inmovilización del músculo, la atrofia inducida por sepsis o el tratamiento con glucocorticoides, fenómenos causantes de atrofia muscular (Bodine et al., 2001b; Glass, 2005).

MURF1 es una proteína que posee 3 dominios: un dominio dedos de zinc RING el cual tiene la actividad de ubiquitina ligasa, un dominio hélice superenrollada que participa en la formación de heterodímeros entre MURF1 y MURF2, y una caja B que participa en la formación de homodímeros. MURF1 se localiza en el sarcómero, se une a la proteína titina en la línea M, así como a la cadena pesada de miosina y puede ubiquitinarla. También se ha informado que induce la ubiquitinización de la forma cardíaca de troponina I y la degradación de la cadena ligera de miosina y la proteína C de unión a miosina. Como otra de sus funciones, se ha demostrado que MURF1 puede encontrarse en el núcleo celular, interactuando con elementos reguladores de la transcripción como GMEB-1, lo que sugiere una función como regulador de la transcripción (Bodine et al., 2001b; Glass, 2005; Eggerman y Glass, 2014).

MAFbx contiene un dominio caja F que es capaz de unirse al sustrato únicamente después de que éste ha sido modificado postraduccionalmente, esto sugiere que la vía de degradación mediada por MAFbx, necesita un estímulo previo de fosforilación para que el sustrato pueda ser degradado por esta ubiquitina ligasa. Uno de los sustratos sugeridos de MAFbx es MyoD y calcineurina. Además, se ha descrito que puede actuar sobre el factor iniciador de la transcripción eIF3-f induciendo su degradación y posterior contribución a la inhibición de la transcripción. En estudios *in vivo*, se ha

demostrado que ratones dobles KO para MURF1 y/o MAFbx son fenotípicamente normales, pero bajo condiciones que promueven la atrofia muscular, hay una menor pérdida de masa muscular en comparación de los ratones control. Estos resultados sugieren que la inhibición de determinadas ubiquitina ligasas puede modular la proporción de masa muscular que se pierde bajo estímulos de atrofia muscular (Bodine et al., 2001b; Glass, 2005, Eggerman y Glass, 2014).

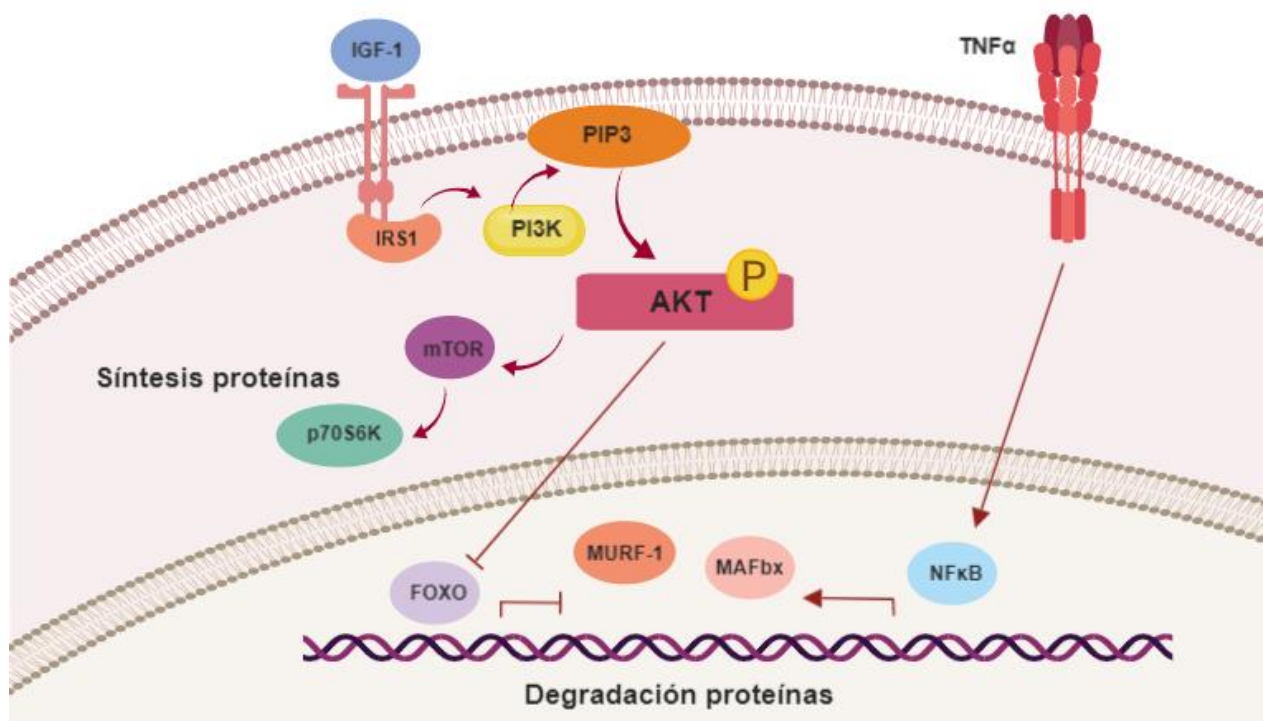


Fig. 5. Mecanismos de anabolismo y catabolismo frente a estímulos externos en el músculo esquelético. Abreviaciones: TNF α (factor de necrosis tumoral alpha), IGF1 (factor de crecimiento insulínico tipo 1), IRS1 (sustrato del receptor de insulina 1), PI3K (fosfoinositol 3-cinasa), PIP3 (fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato), AKT (proteína cinasa B), mTOR (diana de rapamicina en células de mamífero), p70S6K (proteína cinasa ribosómica S6 beta-1), NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas), MURF1 (ubiquitina ligasa muscular E3 con dominio de dedos de zinc RING), MAFbx (ubiquitina ligasa muscular E3 con caja F), FOXO (factor de transcripción Forkhead O1) (tomado de Sishi et al., 2011).

Por otra parte, la obesidad ocasiona una inflamación crónica de bajo grado, así como una elevación de $\text{TNF}\alpha$, el cual juega un papel crítico en la atrofia del músculo esquelético. El mecanismo de acción de $\text{TNF}\alpha$ está mediado por sus receptores TNF-R1 Y TNF-R2 (Fig. 5), y desencadena la activación subsecuente de $\text{NF-}\kappa\text{B}$. La activación de este factor está regulada por IKK , la cual fosforila a $\text{I}\kappa\text{B}$, ocasionando su degradación vía proteosoma, lo que resulta en la activación de $\text{NF-}\kappa\text{B}$. Este factor de transcripción induce la sobreexpresión transcripcional de la ubiquitina ligasa MURF1 , descrita como inductora de la degradación de múltiples proteínas musculares. Por otra parte, la ubiquitina ligasa MAFbx , se sobreexpresa por la vía de señalización de la proteína quinasa activada por mitógenos p38 (MAPK) , llevando de igual manera a la degradación de proteínas musculares (Sishi et al., 2011).

Estas hipótesis que postulan la desregulación de vías de señalización catabólicas y anabólicas han sido demostradas en diversos estudios. El ejemplo más claro es el modelo murino de obesidad inducida por dieta elaborado por Sishi y colaboradores (2011), en el cual observaron que el grupo de animales obesos presentaba una reducción significativa del área transversal de la fibra muscular del músculo gastrocnemio, además de un incremento significativo de los receptores para $\text{TNF}\alpha$ (TNFR1 y TNFR2). Río abajo de esta cascada de señalización encontraron un incremento significativo en la fosforilación $\text{NF-}\kappa\text{B}$ así como la inducción de la ubiquitina ligasa MURF1 . Por otro lado, en cuanto a la vía inductora del anabolismo de proteínas celulares, el grupo de animales obesos mostró una reducción significativa en la fosforilación de Akt, mTOR y el factor de transcripción FOXO (Sishi et al., 2011).

En referencia a la participación de la acumulación de lípidos en la atrofia muscular, se ha descrito que la acumulación intracelular de ácidos grasos en tejido muscular puede llevar a un deterioro apoptótico del músculo. También, esta acumulación de lípidos en músculo esquelético en forma de

triacilglicerol y sus derivados como diacilglicerol, acil-CoA de cadena larga y ceramidas, se han asociado con una mayor insensibilidad a la insulina. Estas moléculas parecen actuar de manera directa o indirecta con proteínas involucradas en la cascada de señalización de la insulina llevándola a su desregulación (Consitt et al., 2009).

Finalmente, resulta de relevancia mencionar que, en la obesidad se ha descrito un bloqueo en la translocación a la membrana del receptor a glucosa GLUT4, disminuyendo la capacidad de las células musculares de obtener glucosa plasmática. Esto parece llevar al uso preferente de los lípidos acumulados intracelularmente como fuente de energía, de manera general, este fenómeno aumenta los procesos oxidativos dentro de las células musculares llevando a una desregulación metabólica y posterior pérdida de función muscular (Goodpaster et al., 2001; Kusminski et al., 2009).

El fenómeno de degradación muscular asociado a la obesidad y al sobrepeso, se ha posicionado como una condición de relevancia clínica dada las implicaciones que tiene en la calidad de vida de los pacientes. Las vías de señalización mediadas en inicio por Akt parecen ser ejes importantes en la regulación de la síntesis de proteínas musculares, así como la degradación de componentes del aparato muscular. Con la presente evidencia, resulta de relevancia, por una parte, determinar los cambios tanto a nivel de ARNm como de proteína, de los genes participantes en estas cascadas de señalización durante la condición de obesidad asociada a atrofia muscular, así como estudiar moléculas capaces de modular las vías de activación en crías de madres con dieta alta en grasa y con o sin dieta postnatal alta en grasa también.

3.5. Células satélite y diferenciación de músculo esquelético.

La regeneración del músculo esquelético es un proceso orquestado con la contribución de distintos elementos como factores de transcripción específicos de músculo esquelético, células satélites, células troncales, factores tróficos y matriz extracelular. La regeneración es un proceso altamente

sincronizado que involucra la activación de diversas respuestas celulares y moleculares, en la cual existe un delicado equilibrio entre el proceso de inflamación y el de reparación (Chargé y Rudnicki, 2004). Además de lo ya mencionado en referencia a la desregulación de cascadas de señalización involucradas en la generación y degradación de proteínas musculares, la obesidad es capaz de interferir con el proceso de diferenciación del músculo esquelético. El tejido muscular adulto tiene un proceso de diferenciación particular, en el cual, en respuesta a señales del ambiente circundante, las células musculares troncales quiescentes, también llamadas células satélite, se activan y comienzan un proceso de proliferación. Esta inicial división asimétrica ayuda a mantener el reservorio de células satélite y dar lugar a células miogénicas que posteriormente se convertirán en mioblastos e iniciarán el proceso de diferenciación celular (Perdiguero et al., 2009). Las células satélites se localizan en la periferia de la fibra muscular, en la lámina basal que rodea a las miofibrillas individuales; se consideran células mononucleares indiferenciadas e histológicamente poseen abundante citoplasma con pocos organelos, un núcleo pequeño y grandes cantidades de heterocromatina (Chargé y Rudnicki, 2004). El proceso de activación de las células satélite involucra la presencia de factores de transcripción específicos de músculo esquelético llamados MRFs, incluyen MRF4, miogenina, MyoD y Myf5 (Pavlath et al., 2003; Karalaki et al., 2009). Existen muchas señales ambientales que pueden activar a las células satélite, por ejemplo, moléculas de adhesión, factores de crecimiento y citocinas; las cuales pueden provenir del tejido circundante, compuesto por fibroblastos, células intersticiales, macrófagos residentes, células endoteliales, pericitos y mesangioblastos. Estas señales extracelulares se transmiten a través de cascadas de señalización, entre las que destacan la vía de las MAPK y p38 y la vía IGF1-Akt. Estas cascadas de señalización pueden regular a la baja la expresión de genes relacionados con el estado de quiescencia y activar la expresión de factores reguladores específicos para la diferenciación muscular antes mencionados (Perdiguero et al., 2009).

El factor de transcripción Pax7, es característico de las células satélite, mientras que los factores de transcripción MyoD y Myf5 se expresan en mioblastos indiferenciados en proliferación. Después de un daño a la fibra muscular, las células satélites activadas, coexpresan Pax7 y MyoD, y tras cierto número de rondas de proliferación, algunas de ellas regulan a la baja Pax7, manteniendo la expresión de MyoD; son estas células las que proceden a diferenciarse en mioblastos, mientras que las células Pax7+/MyoD- son aquellas que se mantienen quiescentes o con proliferación más disminuida (Zammit et al., 2004). La miogenina y el MRF4 se expresan posteriormente, en una etapa temprana y tardía de diferenciación, respectivamente. Se ha demostrado que Myf5 es un gen diana de Pax7 en células satélite tras su activación. Posteriormente, las células satélites activadas expresan Pax7 y Myf5, lo que regula al alta la expresión de MyoD, llevando a las células a un estado pro proliferativo (Perdiguero et al., 2009).

Las células satélites están limitadas por un ambiente fisiológico complejo, el cual está alterado en condiciones de obesidad (D'Souza et al., 2015); también se ha mostrado que la presencia de macrófagos infiltrantes de tejido puede conducir a una disminución en la capacidad de diferenciación de las células satélite (Tidball et al., 2010). Por otra parte, en el contexto de obesidad, hay menos fibras oxidativas, y más fibras glucolíticas (Pattanakuhar et al., 2017); las fibras oxidativas se caracterizan por mayor densidad de células satélite, por lo que los individuos con obesidad podrían tener una disminución en el número de células satélite también (Karalaki et al., 2009).

3.6. (-)-epicatequina y músculo esquelético

A lo largo de las últimas décadas, se han investigado numerosas intervenciones para tratar y prevenir el desarrollo de la obesidad; algunos estudios han descrito el uso de flavonoides presentes en alimentos de origen natural como moléculas capaces de prevenir diversos trastornos

metabólicos, incluida la obesidad. Uno de estos flavonoides es la (-) - epicatequina (Epi), molécula abundante en diversos alimentos como la hoja de té verde y el cacao, la cual ha mostrado efectos beneficiosos sobre algunos parámetros metabólicos observados en la obesidad (Heiss et al., 2003; Meydani y Hasan, 2010).

La (-) -epicatequina es un estereoisómero de la catenina que pertenece al grupo de los flavonoides (flavan-3-ols) que se encuentran en mayor concentración en los granos de cacao. En referencia a sus parámetros metabólicos, se ha determinado que tras la ingesta, la (-)-epicatequina entra a la circulación sanguínea como metabolitos de fase II (glucurónidos, sulfatos y metilos), los metabolitos principales de esta molécula son los metabolitos estructuralmente relacionados con la (-)-epicatequina (SREMs por sus siglas en inglés) y los metabolitos de fisión de anillos 5C (5C-RFMs por sus siglas en inglés). Se han realizados diversos estudios para determinar su porcentaje de absorción, así como sus metabolitos en el organismo, encontrando resultados similares, aunque con diferencias menores en la identificación total de sus metabolitos de menor proporción. El grupo de investigación de Ottaviani y colaboradores (2012), determinó los parámetros metabólicos de la (-)-epicatequina, tras la ingestión de una bebida a base de cacao con 476 μmol de (-)-epicatequina y 66 μmol de ($\pm$)-catequina. En primera instancia se identificaron los SREMs con una concentración máxima a las 2 h tras la ingesta de la bebida, lo que es indicativo de su absorción en intestino delgado. El principal SREM detectado fue (-)-epicatequina-3'-O-glucurónido; en concentraciones más bajas se detectó 4'-O-metilepicatequina-7-O-glucurónido. El principal SREM sulfatado es (-)-epicatequina-3'-sulfato, con detección más baja de (-)-epicatequina-5-sulfato y (-)-epicatequina-7-sulfato. Otro estudio (Actis-Goretta et al., 2012) evaluó la ingesta de chocolate amargo con 241 μmol de (-)-epicatequina y 90 μmol de ($\pm$)-catequina, identificando de igual manera que los principales SREMs detectados son (-)-epicatequina-3'-O-glucurónido y (-)-epicatequina-3'-sulfato, con variaciones en el tiempo para alcanzar su concentración máxima (3 h).

Estudios posteriores con [2-¹⁴C] (-) -epicatequina radiomarcada y estereoquímicamente pura han determinado de manera precisa su metabolismo en humanos (Ottaviani et al., 2016). En términos generales se determinó que los SREMs entran rápidamente en el sistema circulatorio a través del intestino delgado, y a medida que estos son excretados a través de los riñones, son reemplazados gradualmente por los 5C-RFM y el ácido 3- hidrácílico, los cuales se absorben en regiones posteriores del tracto gastrointestinal, en el colon; además, comienzan a identificarse ácidos hipúricos de origen hepático. La mayor parte de la conversión se lleva a cabo en el enterocito antes de su paso al sistema circulatorio; y tras su absorción, la molécula tiene metabolismo hepático. En total se ha evidenciado que cerca del 89% de la ingesta de epicatequina se identifica como metabolitos de excreción urinaria (Ottaviani et al., 2016; Borges et al., 2018).

Sin embargo, se ha identificado que el metabolismo de la (-)-epicatequina difiere entre humanos y en otras especies animales. Borges y colaboradores (2018) determinaron los metabolitos de [¹⁴C]epicatequina en ratas, encontrando diferencias entre los perfiles de SREMs y 5C-RMFs entre estos animales y los humanos. Mientras que en humanos los principales SREM plasmáticos son (-)-epicatequina-3'-O-glucurónido y (-)-epicatequina-3'-sulfato, ninguno de estos metabolitos se detectó en ratas, donde los principales SREMs son 3'-O-metil(-)-epicatequina, (-)-epicatequina-5-O-glucurónido y 3'-O-metil(-)-epicatequina-5-O-glucurónido. Además, en ratas, a diferencia de los humanos, la Epi [¹⁴C] no metabolizada se encuentra en plasma y orina (Borges et al., 2016; Ottaviani et al., 2016; Borges et al., 2018).

Como se ha mencionado anteriormente, la Epi se ha descrito como un polifenol capaz de modular algunas vías involucradas en afectaciones clínicas relacionadas a la obesidad. Además, se ha publicado que reduce el riesgo cardiovascular y promueve la proliferación osteogénica, diferenciación y mineralización. De manera particular, se ha visto que es capaz de modular el efecto de las especies reactivas de oxígeno en los tejidos, ya sea por su reacción directa con ellas o a través

de la interacción con sus vías de síntesis. También se ha visto que Epi es capaz de inhibir la expresión de iNOS inducida por IL-1, al bloquear la localización nuclear de la subunidad p65 del factor de transcripción NF- κ B (Heiss et al., 2003; Meydani y Hasan, 2010; Shay et al., 2015).

En referencia al papel de la Epi en el músculo esquelético, se ha informado que el tratamiento con este flavonoide, en ratones jóvenes, ocasiona una mejora significativa en la capacidad oxidativa y la angiogénesis del músculo esquelético. Gutiérrez-Salmean y colaboradores (2014) examinaron los efectos de la administración de Epi en un modelo murino de ratones jóvenes (6 meses) y viejos (26 meses), encontrando que el tratamiento con Epi es capaz de disminuir en un 15% y 21% los niveles de miostatina en ratones jóvenes y viejos respectivamente. Además, se demostró un incremento de los factores miogénicos MEF2, Myf5 y miogenina tanto en ratones jóvenes como viejos, así como un aumento del 19% en MyoD en ratones viejos (Gutiérrez-Salmean et al., 2014). En modelos humanos se ha visto que un tratamiento corto, de 7 días con Epi, es capaz de aumentar la fuerza muscular en mano hasta un 7%, así como inducir un incremento significativo de hasta 16.6% en los niveles de folistatina/miostatina. La miostatina ha sido reconocida como un inhibidor del crecimiento muscular y se han encontrado niveles incrementados en enfermedades asociadas a desgaste muscular. De manera paralela, se ha encontrado que la folistatina inhibe la actividad de la miostatina al unirse a esta molécula e interferir con su unión al receptor (Gutiérrez-Salmean et al., 2014).

Por otra parte, Lee y colaboradores (2017) han demostrado que la Epi promueve la diferenciación miogénica *in vitro*, mostrando que el tratamiento de mioblastos con Epi, potencializa la expresión de MHC, MyoD y miogenina de manera dosis dependiente. Además, este tratamiento con Epi induce la formación de miotubos más grandes, con más núcleos, reduciendo la proporción de miocitos mononucleares, y elevando la proporción de miotubos polinucleares (Lee et al., 2017).

En referencia a sus mecanismos moleculares, se ha descrito que Epi potencializa la activación de MyoD y la diferenciación de mioblastos a través de la activación de cascadas de señalización promiogénicas, p38MAPK y Akt, incrementando los niveles de pp38 y pAkt de manera dosis dependiente (Lee et al., 2017).

4. ANTECEDENTES

El modelo de obesidad materna inducida por dieta sobre el cual se desarrolló el proyecto ha sido descrito abundantemente en la última década por el grupo de investigación de la Dra. Elena Zambrano en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Se ha descrito que la dieta materna alta en grasas es capaz de inducir alteraciones metabólicas y fenotípicas propias de la obesidad (Rodríguez-González et al., 2022) y, de manera subsecuente, este antecedente de obesidad materna, induce cambios en la progenie, como un aumento de adiposidad, aumento de acumulación de tejido adiposo, alteraciones en parámetros bioquímicos relacionados al metabolismo energético, como un aumento de insulina plasmática y triacil glicerol, además de alteraciones en enzimas hepáticas (Rodríguez-González et al., 2019), de manera interesante, estos cambios son dependientes de la edad de los animales, algunos de ellos presentándose en etapas más tempranas (día 36 de la vida posnatal) y otros en etapas avanzadas de la vida posnatal (día 650 de la vida posnatal). Por otra parte, la relación que existe entre la Epi y la obesidad en un contexto de programación fetal inducida por obesidad materna surge de los resultados publicados por el grupo de investigación bajo la dirección de la Dra. Canto Cetina en la Unidad de Investigación en Obesidad de la Facultad de Medicina, UNAM. En este grupo de investigación, se ha demostrado que la obesidad materna inducida por dieta alta en grasas, en un modelo murino de ratas Wistar de 245 días de vida posnatal, induce alteraciones metabólicas en la progenie, aún bajo una dieta control en la vida posnatal (De los Santos et al., 2020); estos animales presentan un incremento en los niveles de insulina y el índice HOMA-IR, así como una concentración elevada en suero de triacilglicéridos y leptina. Además, se ha trabajado este modelo con un tratamiento posnatal de Epi durante 15 días, a partir del día 230 de vida posnatal, y se ha demostrado que la administración del flavonoide ocasiona una disminución en todos los índices antes mencionados en las ratas F1, resultados que demuestran los posibles efectos benéficos de este

flavonoide en el desarrollo de la obesidad y complicaciones en otros tejidos (De los Santos et al., 2020).

Además de estos parámetros bioquímicos, se ha demostrado que, a esta edad, la progenie de madres obesas, aun cuando no presentan un aumento de peso corporal, tienen un índice de adiposidad elevado en comparación de los controles, y que el tratamiento con Epi es capaz de disminuir de manera significativa esta adiposidad (Fig. 6) (De los Santos et al., 2020). Al determinar los depósitos de grasa visceral, se demostró que las crías de madres obesas presentan una mayor cantidad de grasa visceral en distintos depósitos, y al igual que lo observado en los parámetros bioquímicos, el tratamiento con Epi ocasiona una disminución en la acumulación de la grasa visceral (Fig. 7) (De los Santos et al., 2020). Al analizar de manera particular las características morfológicas los adipocitos, se demostró que la progenie de madres obesas presenta un incremento en el tamaño y número de adipocitos. Nuevamente, el tratamiento con Epi reduce el número de adipocitos y su tamaño (Fig. 8) (De los Santos et al., 2020).

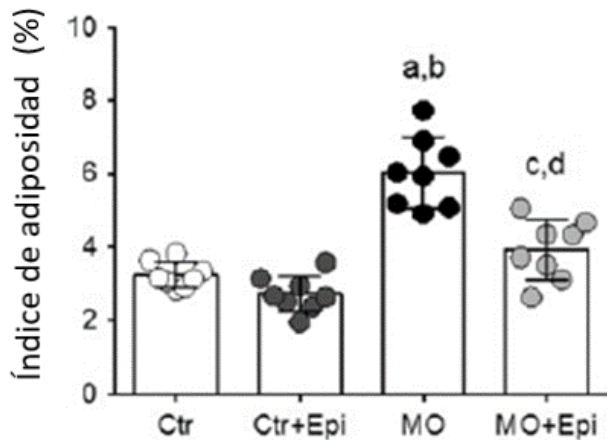


Fig. 6. Índice de adiposidad en los grupos de experimentación al día 245 posnatal (F1). Los descendientes de madres con obesidad muestran un aumento del índice de adiposidad, mientras que el tratamiento durante 15 días con Epi reduce este parámetro. a $p < 0.01$ vs Ctr; b $p < 0.01$ vs Ctr + Epi; c $p < 0.05$ vs Ctr + Epi; d $p < 0.01$ vs MO (tomado De los Santos et al., 2020).

Grupos descendientes de madres control (Ctr), descendientes de madres control con tratamiento posnatal con Epi durante 15 días (Ctr + Epi), descendientes de madres con obesidad (MO), descendientes de madres con obesidad con tratamiento posnatal con Epi durante 15 días. Los resultados están expresados como media $\pm$ desviación estándar. Se utilizó ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples Tukey. $n = 8$ ratas para cada grupo experimental.

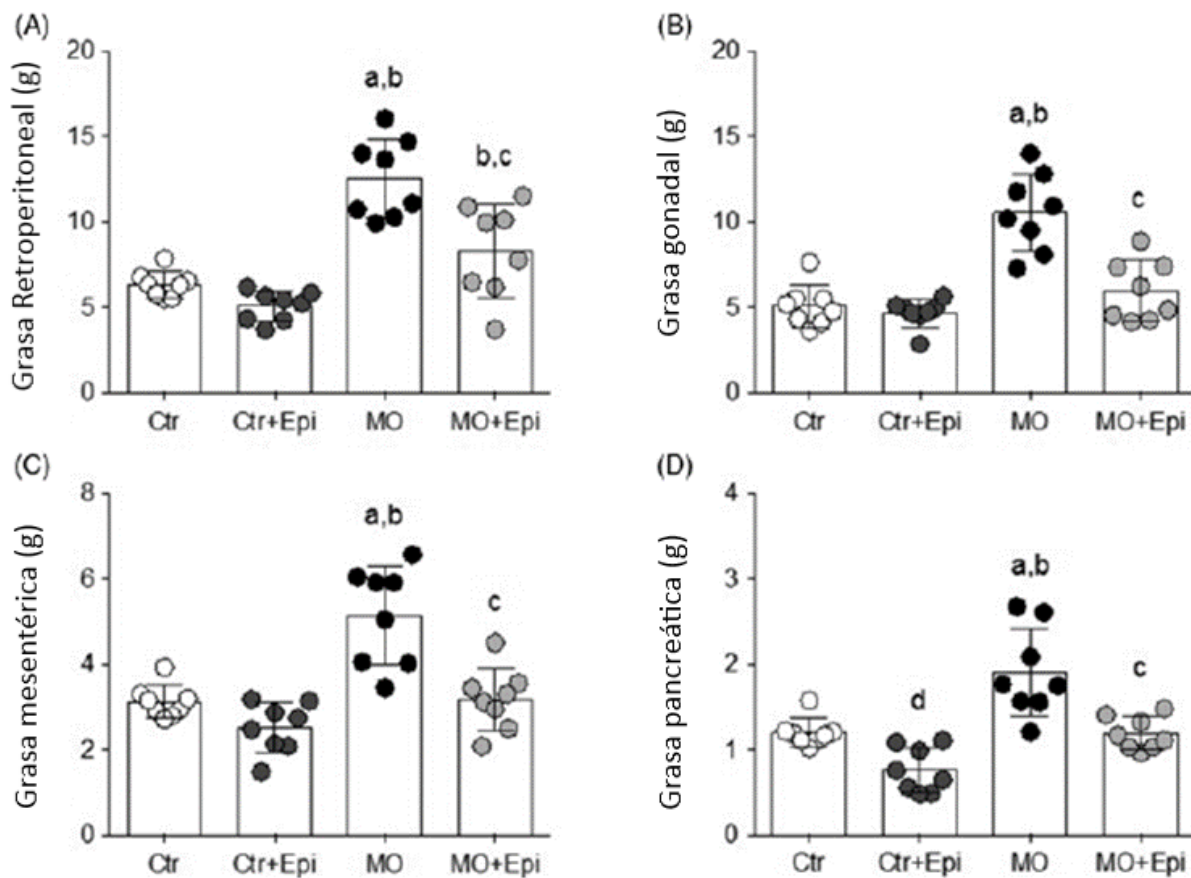


Fig. 7. Pesos de diferentes depósitos de grasa en los grupos de experimentación al día 245 posnatal (F1) A. Grasa retroperitoneal B. Grasa gonadal C. Grasa mesentérica y D. Grasa pancreática. Los descendientes de madres con obesidad presentan un aumento en el peso de diversos depósitos de grasa, mientras que la administración de Epi durante 15 días disminuye el peso de estos depósitos.

a $p < 0.01$ vs Ctr; b $p < 0.01$ vs Ctr + Epi; c $p < 0.01$ vs MO; d $p < 0.05$ vs Ctr (tomado De los Santos et al., 2020).

Grupos descendientes de madres control (Ctr), descendientes de madres control con tratamiento posnatal con Epi durante 15 días (Ctr + Epi), descendientes de madres con obesidad (MO), descendientes de madres con obesidad con tratamiento posnatal con Epi durante 15 días. Los resultados están expresados como media $\pm$ desviación estándar. Se utilizó ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples Tukey. $n = 8$ ratas para cada grupo experimental.

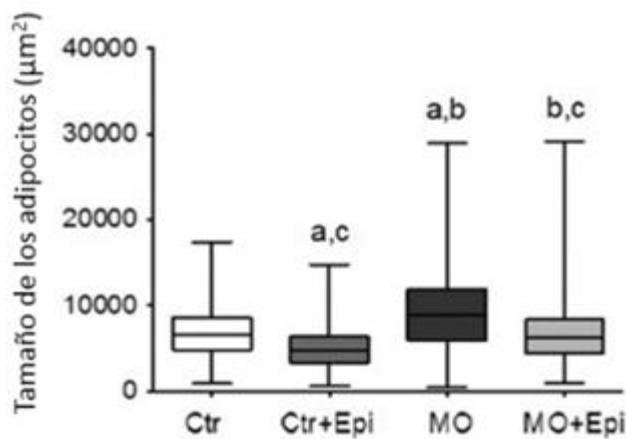


Fig. 8. Características del tejido adiposo de los grupos de experimentación al día 245 posnatal (F1). Comparación del tamaño de los adipocitos. Los adipocitos de la progenie de madres con obesidad presentan un aumento en su tamaño, el tratamiento con Epi durante 15 días disminuye el tamaño de los adipocitos. a $p < 0.01$ vs Ctr; b $p < 0.01$ vs Ctr + Epi; c $p < 0.01$ vs MO (De los Santos et al., 2020).

Grupos descendientes de madres control (Ctr), descendientes de madres control con tratamiento posnatal con Epi durante 15 días (Ctr + Epi), descendientes de madres con obesidad (MO), descendientes de madres con obesidad con tratamiento posnatal con Epi durante 15 días. Los resultados están expresados como media $\pm$ desviación estándar. Los resultados están expresados como mediana $\pm$ rango. Se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis y la prueba *post hoc* Conover. $n = 1200$ células por cada grupo experimental. $n = 8$ ratas para cada grupo experimental.

Derivado de estos resultados con animales a 245 días de vida posnatal, se comenzó a trabajar con un modelo más joven de ratas, de 110 días de vida posnatal, considerando un grupo de progenie de madres control (C), un grupo de progenie de madres con obesidad (MO), y ambos grupos con dos duraciones de tratamiento con (-)-epicatequina (durante 15 y 90 días) (C +Epi corto, C + Epi largo, MO + Epi corto, MO + Epi largo) (Fig. 9). A esta edad, se describió que la progenie de madres con obesidad (MO) presenta un aumento en el porcentaje de masa grasa total y una disminución en el porcentaje de masa magra, sin presentar cambios en el peso corporal total, en comparación con el grupo control (C). Por otra parte, el tratamiento durante 90 días con el flavonoide Epi es capaz de reducir el peso corporal y porcentaje de masa grasa y aumentar el porcentaje de masa magra en la progenie de madres con obesidad (MO vs. MO + Epi largo) (Fig. 9) (De los Santos et al., 2019). Es interesante notar que estas diferencias de composición corporal, no se reportaron como secundaria a cambios en el consumo de alimento, dado que el consumo de la dieta correspondiente fue similar en todos los grupos experimentales, incluyendo aquellos con tratamiento con el flavonoide (De los Santos et al., 2019). Estos resultados parecen indicar un papel fundamental de la programación fetal inducida por obesidad materna en la pérdida de masa muscular; mientras que la Epi parece tener un papel en la recuperación de esta síntesis proteica. Sin embargo, aún no se conocen los mecanismos mediante los cuales ocurre este fenómeno, razón por la cual se decidió explorar los cambios en tejido musculoesquelético en este modelo.

De manera paralela, se comenzó a investigar el papel de la adición de dos estímulos obesogénicos (dieta materna y posnatal alta en grasas), y se ha reportado que, la dieta posnatal alta en grasas administrada desde el día 21 hasta el día 110 de vida posnatal, es capaz de ocasionar un cuadro de obesidad caracterizado por un aumento en el peso corporal, aumento de grasa total e índice de adiposidad tanto en los animales provenientes de madres control (CHFD) como en los provenientes de madres con obesidad (MOHFD) cuando se comparan con sus respectivos grupos controles (C y

MO respectivamente) (De los Santos et al., 2022). Y al igual que lo observado anteriormente, el tratamiento con Epi durante 15 días fue capaz de disminuir el peso corporal de los animales CHFD y MOHFD (De los Santos et al., 2022), indicando que, frente a este doble estímulo deletéreo, el tratamiento con el flavonoide también tiene un efecto sobre el peso corporal de los animales. De manera interesante, la adición de los dos estímulos obesogénicos, grupo MOHFD, ocasionan un aumento en el consumo de alimento, el cual se ve disminuido con la administración del flavonoide (MOHFD vs. MOHF + Epi corto).

Como se mencionado anteriormente, diversos proyectos han explorado el efecto de la obesidad materna en la progenie, sobre todo en etapas avanzadas de la vida posnatal de los animales, como a 245, 300 o 400 días posnatales (De los Santos, 2020; Bautista et al., 2024), sin embargo, poco se sabe acerca de los cambios que podrían ocurrir a etapas más tempranas de la vida posnatal, razón por la cual resulta de interés estudiar este fenómeno a una edad equivalente a una etapa de adultez temprana. Nuestro grupo de investigación ya ha publicado ciertos datos respecto al modelo en estudio de 110 días de vida posnatal (De los Santos et al., 2019; De los Santos et al., 2022), evaluando las 3 variables de interés: antecedente de obesidad materna, dieta posnatal alta en grasas y tratamiento con Epi, encontrando resultados interesantes que ponen de manifiesto la influencia que tienen estas variables en los cambios a nivel de peso corporal, parámetros metabólicos y depósitos de grasas. Con estos antecedentes, el presente proyecto se centra en determinar el efecto particular de estas variables en el tejido de músculo esquelético.

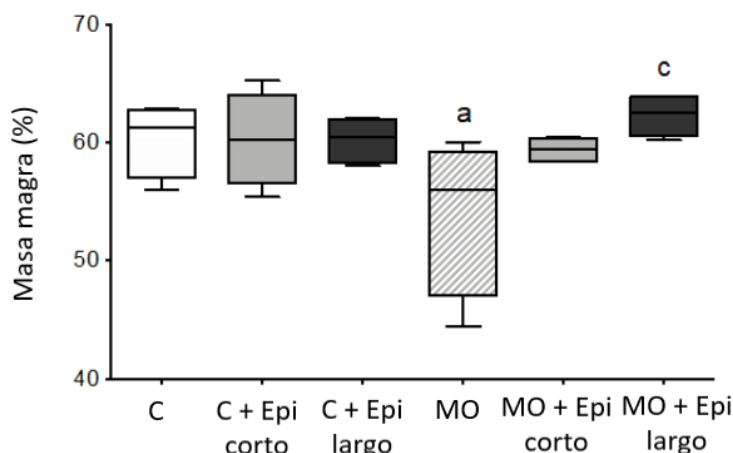


Fig. 9. Efecto de la Epi en la masa muscular de la progenie de 110 días de vida posnatal de madres obesas y madre control, con tratamiento corto de 2 semanas y largo de 13 semanas de Epi. La progenie de madres con obesidad presenta una disminución de masa magra, mientras que el tratamiento con Epi durante 13 semanas induce un aumento en el porcentaje de masa magra. a $p < 0.01$ vs Ctr; c $p < 0.01$ vs MO (De los Santos et al., 2019).

Epi = (-)-epicatequina; C = Ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal chow; C + Epi corto = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal chow intervenidas con Epi durante 2 semanas; C + Epi largo = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal chow intervenidas con Epi durante 13 semanas; MO = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal chow; MO + Epi corto = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal chow intervenidas con Epi durante 2 semanas; MO + Epi largo = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal chow intervenidas con Epi durante 13 semanas. Los resultados están expresados como mediana $\pm$ rango. Se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis seguida de una prueba de comparaciones múltiples Dunn. $n = 4$ ratas para cada grupo experimental.

Finalmente, en otros estudios recientes, se ha determinado un papel de Epi como modulador de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR/p70S6K, en músculo cardíaco, induciendo un aumento en la fosforilación y activación de esta cascada de señales (De los Santos et al., 2017). Lo que no se ha descrito es si esta misma vía de señalización, también involucrada con la síntesis de proteínas

musculares, podría mediar los efectos de la Epi frente al daño muscular inducido por obesidad, ya sea por efecto de una dieta materna alta en grasas y/o una dieta posnatal obesogénica. Teniendo en cuenta la relevancia de esta vía de señalización en la modulación de la síntesis de proteínas musculares, es de interés estudiarla en el contexto de la obesidad y tras el tratamiento con el flavonoide Epi.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

No se conoce de manera precisa si en crías F1 descendientes de madres obesas inducidas por dieta alta en grasa, existe una desregulación en la expresión de genes relacionados con atrofia o genes relacionados con la síntesis de proteínas en el tejido músculo esquelético; y si ésta, se modifica con una dieta posnatal alta en grasas y/o la administración del flavonoide (-)-epicatequina, por lo que se plantean las siguientes preguntas de investigación:

1. ¿Es diferente la expresión de genes relacionados con atrofia o de genes relacionados con la síntesis de proteínas en el tejido músculo esquelético entre crías F1 de madres control vs. las de madres obesas por dieta alta en grasas, siendo alimentadas desde el día 21 hasta el 110 de vida posnatal con dieta control?
2. ¿Es diferente la expresión de genes relacionados con atrofia o de genes relacionados con la síntesis de proteínas en el tejido músculo esquelético entre crías F1 de madres control vs. las de madres obesas por dieta alta en grasas, siendo alimentadas desde el día 21 hasta el 110 de vida posnatal con dieta alta en grasas?
3. ¿La administración del flavonoide (-)-epicatequina, inducirá cambios en la expresión de genes relacionados con atrofia o de genes relacionados con la síntesis de proteínas en el tejido músculo esquelético de crías F1 de madres control vs. las de madres obesas por dieta alta en grasas, siendo alimentadas desde el día 21 hasta el 110 de vida posnatal con dieta control o alta en grasas?

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Comparar la expresión de genes relacionados con atrofia y síntesis de proteínas en tejido muscular esquelético entre crías alimentadas con dieta control o alta en grasas e intervenidas con el flavonoide (-)-epicatequina y descendientes de ratas Wistar controles o con obesidad inducida por dieta alta en grasa.

6.2. Objetivos específicos

1. En músculo gastrocnemio, evaluar la expresión a nivel de ARNm de genes que intervienen en la atrofia muscular [*Murf1*, *MAFbx*, *NFκB*] y de genes reguladores de la síntesis de proteínas musculares [*p70S6K-α*], en las crías F1 alimentadas con dieta control hijas de ratas Wistar control [grupo control (C)] y de ratas Wistar obesas por dieta alta en grasas [grupo de crías MO alimentadas con dieta control (MO)] y ambos grupos experimentales con tratamiento con el flavonoide (-)-epicatequina durante 13 semanas [grupo C+Epi largo y MO+Epi largo].
2. En músculo gastrocnemio, evaluar la expresión de las proteínas que intervienen en la atrofia muscular [MURF, MAFbx, NFκB] y de la cinasa relacionada con la síntesis de proteínas musculares [*p70S6K-α*], en las crías F1 alimentadas con dieta control hijas de ratas Wistar control [grupo control (C)] y de ratas Wistar obesas por dieta alta en grasas [grupo de crías MO alimentadas con dieta control (MO)] y ambos grupos experimentales con tratamiento con el flavonoide (-)-epicatequina durante 13 semanas [grupo C+Epi largo y MO+Epi largo].
3. En músculo gastrocnemio, evaluar la expresión de las proteínas que intervienen en la atrofia muscular [MURF, MAFbx, NFκB] y de la cinasa relacionada con la síntesis de proteínas musculares [*p70S6K-α*], en los grupos experimentales de ratas descendientes de madres

control con dieta posnatal alta en grasas sin Epi (CHFD), con Epi durante 13 semanas (CHFD + Epi), descendientes de madres obesas con dieta posnatal alta en grasas sin Epi (MOHFD) y con Epi durante 13 semanas (MOHFD + Epi).

4. En músculo sóleo, evaluar la expresión de proteínas que intervienen en la atrofia muscular [MURF y MAFbx] y de la cinasa relacionada con la síntesis de proteínas musculares [p70S6K- α] en los grupos experimentales de ratas descendientes de madres control con dieta posnatal chow sin Epi (C), intervenidas con Epi durante 13 semanas (C + Epi), descendientes de madres obesas con dieta posnatal chow sin Epi (MO) y con Epi durante 13 semanas (MO + Epi).
5. En músculo sóleo, evaluar la expresión de proteínas que intervienen en la atrofia muscular [MURF y MAFbx] y de la cinasa relacionada con la síntesis de proteínas musculares [p70S6K- α], en los grupos experimentales de ratas descendientes de madres control con dieta posnatal alta en grasas sin Epi (CHFD), con Epi durante 13 semanas (CHFD + Epi), descendientes de madres obesas con dieta posnatal alta en grasas sin Epi (MOHFD) y con Epi durante 13 semanas (MOHFD + Epi).
6. En músculo gastrocnemio y sóleo, evaluar la expresión a nivel de proteína del marcador de linaje celular [MyoD] de los 8 grupos experimentales antes mencionados: C, C + Epi, MO, MO + Epi, CHFD, CHFD + Epi, MOHFD, MOHFD + Epi.

7. HIPÓTESIS

- 7.1. El antecedente de obesidad materna aumentará la expresión de genes asociados a la atrofia musculoesquelética y disminuirá la expresión de genes relacionados con la síntesis de proteínas de músculo esquelético en las crías F1 alimentadas con dieta chow desde el día 21 hasta el día 110 posnatal en comparación con las crías sin el antecedente de la obesidad materna.
- 7.2. La presencia de una dieta posnatal alta en grasas aumentará la expresión de genes asociados a la atrofia del músculo esquelético y disminuirá la expresión de genes relacionados con síntesis de proteínas musculoesqueléticas en las crías F1 alimentadas con dieta alta en grasa desde el día 21 hasta el día 110 posnatal en comparación con las crías con una dieta posnatal control.
- 7.3. El tratamiento con el flavonoide (-)-epicatequina durante 13 semanas disminuirá la expresión de genes asociados a la atrofia patológica del músculo esquelético secundaria a la obesidad e incrementará la expresión de genes relacionados con síntesis de proteínas de músculo esquelético en las crías F1 alimentadas con dieta alta en grasa en comparación con las crías sin tratamiento con (-)-epicatequina.

8. METODOLOGÍA

8.1. Modelo animal

El protocolo de investigación sobre el modelo animal en el presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Experimentación Animal del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) (CINVA: UIO-1892-17/19-1) y por el La Comisión de Investigación y el Comité de Ética de la Investigación, Facultad de Medicina, Universidad

Nacional Autónoma de México (ref. FM/DI/105/2019). Todos los procedimientos se realizaron siguiendo los Lineamientos para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Recursos de Animales de Laboratorio (<http://www.nal.usda.gov/awic/animal-welfare-act>), y la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

La dieta chow, la dieta alta en grasas, la estandarización del fenotipo femenino (F0) utilizadas para producir descendencia F1 y la intervención con (-)-epicatequina fueron descritas previamente por nuestro grupo de investigación (De los Santos et al., 2019). Brevemente, al destete (día 21), las ratas Wistar albinas hembras (generación F0), fueron asignadas aleatoriamente a un grupo de control (C, n = 4), que recibió la dieta chow de laboratorio (23.9% proteína, 5.0% grasa, 57.9% carbohidratos, 5.1% fibra, 7.0% minerales, y 1.0% vitaminas (gramos/gramos), con un contenido energético de 4.07 kcal/g (Purina 5001, Labdiet, St. Louis, Missouri, USA) o a un grupo de obesidad materna (MO, n = 4) con una dieta rica en grasas (HFD) 23.5% proteína, 20.0% grasa de origen porcino, 5.0% grasa, 20.2% polisacáridos, 20.2% azúcares simples, 5.0% fibra, 5.0% minerales, y 1.0% vitaminas (g/g), con un contenido energético de 4.9 kcal/g, desde el destete (día 21 posnatal) y durante la gestación y lactancia. De manera particular, el fenotipo materno y las alteraciones metabólicas que poseen estos animales (generación F0) han sido descritas en otros artículos (Rodríguez-González et al., 2022). Se ha evidenciado que el fenotipo materno con obesidad utilizado como generación F0, presenta un aumento de peso corporal desde el día 70 de vida posnatal, y este aumento de peso a comparación de los animales control se mantiene elevado durante la gestación y la lactancia, además, estas ratas presentan alteraciones metabólicas que acompañan a la obesidad, como un aumento de triglicéridos plasmáticos e insulina, aumento del índice HOMA e índice de adiposidad que se mantienen a lo largo de la gestación y la lactancia (Rodríguez-González et al., 2022).

Las ocho ratas hembra F0 se colocaron con reproductores macho probados en el día 120 posnatal y concibieron durante el siguiente ciclo. Todas las ratas Wistar hembras F0, mantuvieron la dieta (chow o HFD) durante la gestación y la lactancia (Fig. 10). Los contenidos de minerales y vitaminas en las dos dietas se administraron de acuerdo con la recomendación del Instituto Americano de Nutrición para apoyar las fases de crecimiento, embarazo y lactancia (AIN-93G) (Reeves et al., 1993).

Las crías F1 se destetaron el día 21 posnatal y se alimentaron con una dieta chow o alta en grasas (HFD) durante todo el estudio. En cuanto a los grupos de intervención con (-)-epicatequina, se realizó un protocolo largo de tratamiento con el flavonoide del día 21 al 110 posnatal (13 semanas de tratamiento Epi: protocolo largo) (Ramirez-Sanchez et al., 2014; Cheng et al., 2017; De los Santos et al., 2017; De los Santos et al., 2018). Las crías macho recibieron vehículo (agua) o 1 mg/kg de masa corporal de Epi (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) por sonda oral dos veces al día (Gutiérrez-Salmean et al., 2014; Ramirez-Sanchez et al., 2014; De los Santos et al., 2017; De los Santos et al., 2018). La preparación de Epi se llevó a cabo según las instrucciones del proveedor (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.); brevemente, la solución del flavonoide se preparó a una concentración de 12.5 mg/ml en DMSO/agua al 2 % (v/v) y luego se diluyó con agua hasta una concentración final de 1 mg/ml. El volumen administrado se ajustó de acuerdo con el peso corporal de cada animal y se ajustó con agua a un volumen final de 500 µl para su administración por sonda oral. Se seleccionaron aleatoriamente crías macho del grupo control o de obesidad materna de diferentes camadas para los grupos con dieta posnatal control sin intervención con Epi (C y MO), o para los grupos de intervención con (-)-epicatequina (C + Epi y MO + Epi) (Fig. 10); así como para los grupos con dieta alta en grasas en la vida posnatal (CHFD y MOHFD) y tratamiento con Epi durante 13 semanas (CHFD + Epi, MOHFD + Epi). No se registraron efectos adversos debido a esta intervención dietética y ninguna rata murió antes del final del protocolo experimental. El

consumo de alimento y alteraciones metabólicas propias de estos animales, han sido descritos en otros artículos (De los Santos et al., 2019; De los Santos et al., 2022), en los cuales se ha demostrado que los animales con una dieta posnatal control no tienen un consumo distinto de cantidad de alimento según el grupo de experimentación, y como se ha mencionado anteriormente tampoco poseen diferencias en el peso corporal. Por otra parte, en el modelo animal con dieta posnatal alta en grasas, los grupos con dieta posnatal alta en grasas presentan un aumento en el peso corporal y únicamente para el grupo con un doble estímulo obesogénico (MOHFD) también se describió un aumento en el consumo de alimento (De los Santos et al., 2022)

Se empleó el tejido músculo esquelético de gastrocnemio y sóleo de 48 ratas divididas en 8 grupos: 6 ratas descendientes de madres control con dieta posnatal chow sin Epi (C), 6 ratas descendientes de madres control con dieta posnatal chow intervenidas con Epi durante 13 semanas (C + Epi), 6 ratas descendientes de madres obesas con dieta posnatal chow sin Epi (MO), 6 ratas descendientes de madres obesas con dieta posnatal chow intervenidas con Epi durante 13 semanas (MO + Epi), 6 ratas descendientes de madres control con dieta posnatal alta en grasas sin Epi (CHFD), 6 ratas descendientes de madres control con dieta posnatal alta en grasas intervenidas con Epi durante 13 semanas (CHFD + Epi), 6 ratas descendientes de madres obesas con dieta posnatal alta en grasas sin Epi (MOHFD) y 6 ratas descendientes de madres obesas con dieta posnatal alta en grasas tratadas con Epi durante 13 semanas (MOHFD + Epi) (Fig. 10).

Modelo de Obesidad

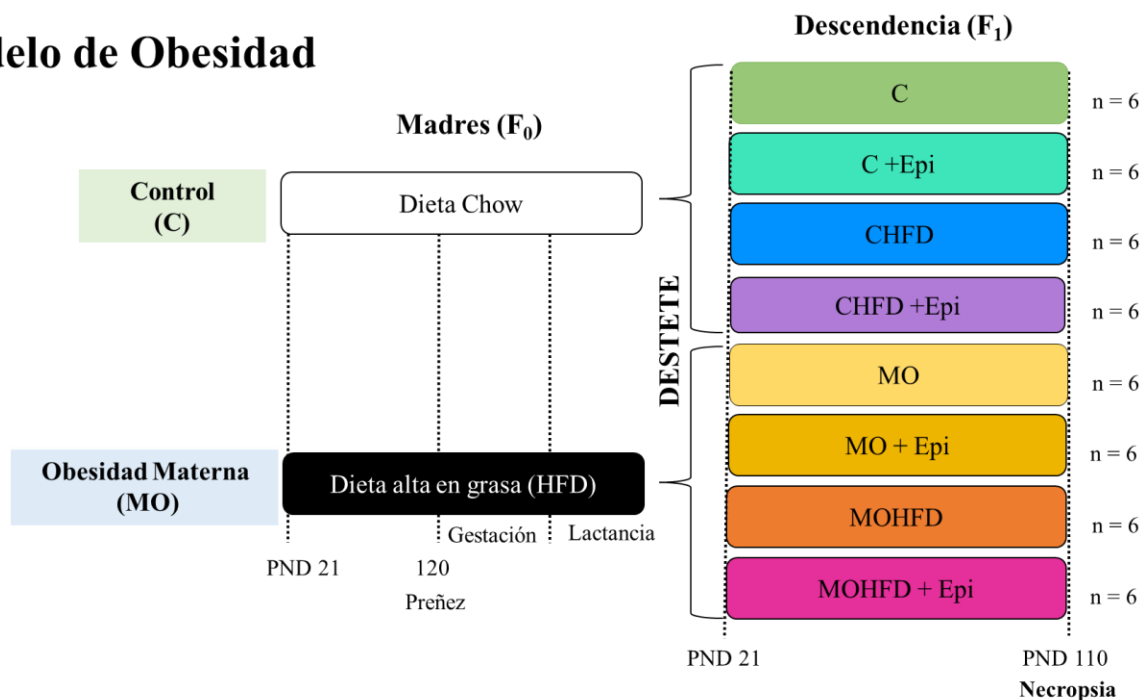


Fig. 10. Modelo de obesidad. Ratas descendientes de madres control con dieta posnatal chow sin Epi (C), ratas descendientes de madres control con dieta posnatal chow intervenidas con Epi durante 13 semanas (C + Epi), ratas descendientes de madres obesas con dieta posnatal chow sin Epi (MO), ratas descendientes de madres obesas con dieta posnatal chow intervenidas con Epi durante 13 semanas (MO + Epi), ratas descendientes de madres control con dieta posnatal alta en grasas sin Epi (CHFD), ratas descendientes de madres control con dieta posnatal alta en grasas intervenidas con Epi durante 13 semanas (CHFD + Epi), ratas descendientes de madres obesas con dieta posnatal alta en grasas sin Epi (MOHFD) y ratas descendientes de madres obesas con dieta posnatal alta en grasas tratadas con Epi durante 13 semanas (MOHFD + Epi).

8.2. Extracción de ARN de tejido músculo esquelético gastrocnemio

En el día posnatal 110, las ratas fueron sacrificadas y se obtuvo el tejido muscular esquelético (gastrocnemio y sóleo) de cada animal. Es importante referir que en un inicio se planteó analizar el tejido de dos músculo esqueléticos de 8 grupos experimentales; sin embargo, debido a la emergencia sanitaria por SARS-CoV-2, lo que llevó a una ausencia de más de un año en el laboratorio por indicaciones de la UNAM y de que nuestra Unidad de Investigación, es una Unidad

Periférica que se encuentra ubicada en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (Instituto receptor de pacientes en la pandemia), el tejido sóleo almacenado para el análisis de expresión de ARN se degradó. Asimismo, no se pudo rescatar las muestras de 4 grupos experimentales del músculo gastrocnemio por degradación del ARN.

Se realizó la extracción de ARN de las 24 muestras de tejido de músculo gastrocnemio de los grupos experimentales control (C), control con tratamiento con Epi durante 13 semanas (C + Epi), descendientes de madres obesas (MO) y descendientes de madres obesas tratadas con Epi durante 13 semanas (MO + Epi). La extracción de ARN de muestras de tejido del músculo gastrocnemio se realizó con el reactivo Invitrogen® TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), siguiendo las instrucciones del proveedor. Posteriormente se verificó la integridad del ARN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y se realizó la cuantificación del mismo, observándose una relación de absorbancia 260 nm/280 nm entre 1.8 y 2.0 para todas las muestras, lo que se consideró como adecuado para su uso posterior.

8.3. Análisis de expresión génica

Se usó ARN (100 ng) para la síntesis de ADN (ADNc) usando los reactivos AgPath-ID™ One-Step RT-PCR (Applied Biosystems™, Carlsbad, CA, EUA) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Se realizó la estandarización para la sonda del gen β -actina (Rn00667869_m1) en el ARN de una muestra representativa de cada grupo experimental (C, C + Epi, MO y MO + Epi), de músculo gastrocnemio, obteniendo una eficiencia adecuada (Eficiencia=2).

La expresión génica de *Murf1* (ubiquitina ligasa muscular E3 con dominio de dedos de zinc RING), *MAFbx* (ubiquitina ligasa muscular E3 con caja F), *NFκB* (factor nuclear potenciador de las

cadenas ligeras kappa de las células B activadas) y *Rps6kb1* (proteína cinasa ribosómica S6 beta-1) fue analizada en tejido de gastrocnemio mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción reversa (RT-qPCR), utilizando las sondas TaqMan on Demand Gene Expression de Applied Biosystem (Applied Biosystems™, Carlsbad, CA, EUA),. Assay ID: Murf1 (Rn00590197_m1), MAFbx (Rn00591730_m1), NFκB (Rn01502266_m1) y Rps6kb1 (Rn00583148_m1). Los valores fueron normalizados a las cantidades relativas de β-actina (Rn00667869_m1) para cada muestra.

La PCR cuantitativa de transcripción reversa se realizó con el equipo LightCycler® 480 (Roche Diagnostics Ltd, Risch-Rotkreuz, Suiza). y las concentraciones relativas de ARNm se calcularon con el software de análisis de cuantificación relativa LightCycler. Todas las muestras se analizaron por duplicado. Para determinar la expresión relativa del gen de interés, se utilizó β-actina como gen de referencia y se aplicó el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para el análisis de los datos.

8.4. Expresión proteica mediante Western blot

Es importante referir que, para el análisis de los niveles de las proteínas de los genes arriba referidos, se estudió tanto el tejido del músculo gastrocnemio, como el músculo sóleo en los 8 grupos experimentales: ratas descendientes de madres control con dieta chow (C), de madres control con dieta chow intervenidas con Epi durante 13 semanas (C + Epi), de madres obesas con dieta chow (MO), de madres obesas con dieta chow intervenidas con Epi durante 13 semanas (MO + Epi), de madres control con dieta alta en grasas (CHFD), de madres control con dieta alta en grasas intervenidas con Epi durante 13 semanas (CHFD + Epi), de madres obesas con dieta alta en grasas (MOHFD) y de madres obesas con dieta alta en grasas tratadas con Epi durante 13 semanas (MOHFD + Epi).

Se homogeneizaron alrededor de 100 mg de músculo gastrocnemio en buffer de lisis RIPA (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, TX, EUA) con inhibidores de proteasa y fosfatasa. Posteriormente, se determinó la integridad de las proteínas a través de electroforesis en un gel de acrilamida SDS-PAGE al 10%, tenidos con el colorante azul de Coomassie, comprobándose la integridad de las proteínas provenientes de cada muestra.

50 µg de proteína se colocaron en un gel SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm (Bio-Rad Laboratories, Life Science Group, Hercules, CA, EUA). Los anticuerpos primarios utilizados fueron: Anti-MURF1 + MURF3 + MURF2 recombinante (ab172479) (Abcam Inc, Waltham, MA, EUA), peso molecular 40 kDa; Anti-Fbx32 recombinante (ab168372) (Abcam Inc, Waltham, MA, EUA), peso molecular 42 kDa; anti-NF-κB p65 (C22B4, Rabbit mAb #4764) (CellSignaling, Danvers, MA, EUA), peso molecular 65 kDa; anti-Phospho-NF-κB p65 (Ser536) (93H1, Rabbit mAb#3033) (CellSignaling, Danvers, MA, EUA); anti-quinasa p70S6 (49D7, Rabbit mAb #2708) (CellSignaling, Danvers, MA, EUA), peso molecular 70 kDa; anti-Phospho-p70 S6 Kinase (Thr389) (108D2, Rabbit mAb #9234) (CellSignaling, Danvers, MA, EUA), peso molecular 70 kDa. Para determinar la presencia de marcadores de diferenciación muscular se utilizó el anticuerpo MyoD (sc-377460) (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, TX, EUA), peso molecular 45 kDa. El anticuerpo anti-Gadph (PA1-988) (ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, EUA), peso molecular 37 kDa se utilizó como control de carga. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: HRP-goat anti-rabbit IgG (111-095-003) y anti-mouse IgG (715-035-150) (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West Grove, PA, EUA).

Se realizó la estandarización de los anticuerpos primarios en muestras de tejido de músculo gastrocnemio de ratas del grupo control (C) para la detección de las proteínas de interés. Las condiciones fueron las siguientes, se bloqueó la membrana 1 hora a temperatura ambiente con leche descremada al 5% en TBS-Tween al 0.1%, se incubaron los anticuerpos primarios durante 12-14

horas a 4°C en BSA al 5% en TBS-Tween al 0.1%, e incubación de los anticuerpos secundarios durante 1 hr a temperatura ambiente en leche descremada al 5% en TBS-Tween al 0.1%. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos entre cada etapa con TBS-Tween al 0.1%. La dilución para todos los anticuerpos recombinantes tanto totales como fosforilados fue de 1:1,000, como proteína constitutiva se utilizó GAPDH a una dilución de 1:15,000. Los anticuerpos secundarios fueron utilizados a las diluciones siguientes: 1:5,000 para el HRP-goat anti-rabbit IgG y 1:10,000 para el anti-mouse IgG.

La detección de la quimioluminiscencia se realizó con el kit SuperSignal[™] West Femto Chemiluminescent Substrate (ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, EUA). La detección de las intensidades de las bandas se cuantificó digitalmente utilizando el escáner C-DiGit (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, EUA) y el software LI-COR Image Studio (http://www.licor.com/bio/products/software/image_studio_lite/) y el software ImageJ (Institutos Nacionales de Salud de EUA, Bethesda, MD, EUA).

8.5. Análisis estadístico

Los datos con distribución normal se expresaron como media $\pm$ desviación estándar de 6 observaciones experimentales individuales. La distribución de los datos se analizó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Es importante referir que debido al diseño factorial de este estudio, se analizaron las posibles interacciones entre las variables, en el caso del análisis de la expresión génica se utilizó una ANOVA de dos vías, seguido de un análisis de comparaciones múltiples de Tukey.

Para la expresión proteica, se realizó un análisis de ANOVA de tres vías, ésto con el fin de determinar la contribución de cada variable al comportamiento del modelo en estudio; es decir, para evaluar el efecto de la dieta materna se compararon los grupos con antecedente de dieta

materna chow (C, C+ Epi, CHFD y CHFD + Epi) contra los grupos con dieta materna alta en grasas (MO, MO + Epi, MOHFD y MOHFD + Epi). Para evaluar la contribución del efecto de la dieta posnatal alta en grasas se compararon los grupos con dieta posnatal chow (C, C + Epi, MO, MO + Epi) contra los grupos con dieta posnatal alta en grasas (CHFD, CHFD + Epi, MOHFD y MOHFD + Epi) y finalmente para evaluar el efecto del tratamiento con Epi, se compararon los grupos sin tratamiento con el flavonoide (C, MO, CHFD y MOHFD) contra los grupos con tratamiento con Epi (C + Epi, MO + Epi, CHF + Epi y MOHFD + Epi).

Posteriormente, para comparar grupos de manera individual, se realizó un análisis de ANOVA de una vía, seguido de un análisis de comparaciones múltiples de Tukey con el fin de determinar diferencias puntuales entre los grupos individuales.

Los datos fueron analizados con el software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA) y se tomó una $p < 0.05$ como significativa.

9. RESULTADOS

9.1. Análisis de la expresión relativa de los genes involucrados en la atrofia o síntesis de proteínas musculares en el músculo gastrocnemio de los grupos experimentales.

Con respecto a los genes que codifican para las proteínas relacionadas con la atrofia muscular se realizó la cuantificación relativa de la expresión de la ubiquitina ligasa *Murf1* y de la ubiquitina ligasa *MAFbx*, en los grupos experimentales C, C + Epi, MO y MO + Epi. El tratamiento largo de Epi disminuyó la expresión transcripcional de *Murf1* en ambos grupos tratados con el flavonoide ($p = 0.036$), representando una variabilidad del 16.83% del modelo a causa de este factor (Fig. 11). Sin embargo, para la expresión relativa de *MAFbx* no se encontró influencia de alguna de las variables sobre el modelo, ni diferencias significativas entre los cuatro grupos experimentales (Fig. 12).

A)

Fuente de variación	% de variación total	valor de p	F (DFn, DFd)
Tratamiento Epi	16.83	0.036	F (1, 20) = 5.068

B)

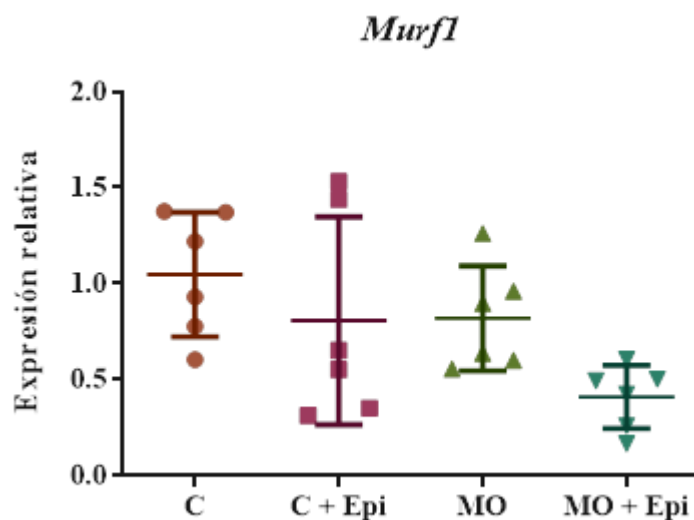


Fig. 11. Expresión relativa del ARNm de *Murf1* en músculo gastrocnemio. La administración de Epi durante 13 semanas disminuyó la expresión transcripcional de *Murf1* en los grupos C + Epi y MO + Epi en comparación con los grupos C y MO en músculo gastrocnemio. A) Resultados de la prueba ANOVA de dos vías mostrando las variables cuya influencia es significativa en el modelo de experimentación. B) Expresión relativa de *Murf1* ARNm en músculo esquelético de gastrocnemio.

Epi = (-)-epicatequina; C = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal chow; C + Epi = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal chow intervenidas con Epi durante 13 semanas; MO = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal chow; MO + Epi = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal chow intervenidas con Epi durante 13 semanas. Los resultados están expresados como media $\pm$ desviación estándar. Se utilizó ANOVA de dos vías y prueba de comparaciones múltiples Tukey. n=6 ratas para cada grupo experimental.

A)

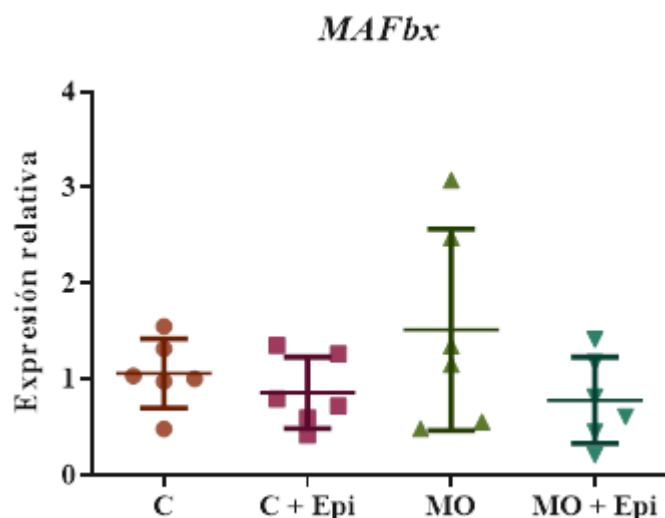


Fig. 12. Expresión relativa de *MAFbx* en músculo gastrocnemio. La dieta materna y/o la administración de Epi durante 13 semanas no modificaron la expresión de *MAFbx*. A) Expresión relativa de *MAFbx* ARNm en músculo esquelético de gastrocnemio.

Epi = (-)-epicatequina; C = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal chow; C + Epi = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal chow intervenidas con Epi durante 13 semanas; MO = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal

chow; MO + Epi = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal chow intervenidas con Epi durante 13 semanas. Los resultados están expresados como media $\pm$ desviación estándar. Se utilizó ANOVA de dos vías y prueba de comparaciones múltiples Tukey. n=6 ratas para cada grupo experimental.

La cuantificación relativa de *NFκB* reveló que el tratamiento con el flavonoide indujo una disminución en la expresión de este factor de transcripción en los grupos con tratamiento con Epi (C + Epi y MO + Epi) ($p = 0.038$) con una variabilidad de 19.59% atribuible a esta variable (Fig. 13).

A)

Fuente de variación	% de variación total	valor de p	F (DFn, DFd)
Tratamiento Epi	19.59	0.038	F (1, 20) = 4.942

B)

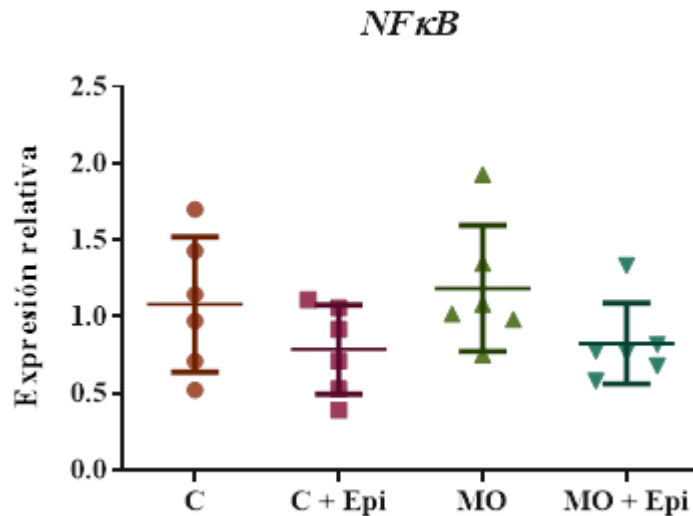


Fig. 13. Expresión relativa de *NFκB* en músculo gastrocnemio. La administración de Epi durante 13 semanas disminuyó la expresión transcripcional de *NFκB* en los grupos C + Epi y MO + Epi en comparación con los grupos C y MO en este músculo. A) Resultados de la prueba ANOVA de dos vías mostrando las variables cuya influencia es significativa en el modelo de experimentación. B) Expresión relativa de *NFκB* ARNm en músculo esquelético de gastrocnemio.

Epi = (-)-epicatequina; C = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal chow; C + Epi = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal chow intervenidas con Epi durante 13 semanas; MO = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal chow; MO + Epi = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal chow intervenidas con Epi durante 13 semanas. Los resultados están expresados como media $\pm$ desviación estándar. Resultados expresados como media $\pm$ desviación estándar. Se utilizó ANOVA de dos vías y prueba de comparaciones múltiples Tukey. n=6 ratas para cada grupo experimental.

Finalmente, la cuantificación relativa de la expresión de la cinasa *p70S6K- α* , que interviene en la síntesis de proteínas, en los cuatro grupos experimentales no reveló influencia de la dieta materna ni del tratamiento con Epi sobre el modelo, así como diferencias significativas entre los grupos experimentales (Fig. 14).

A)

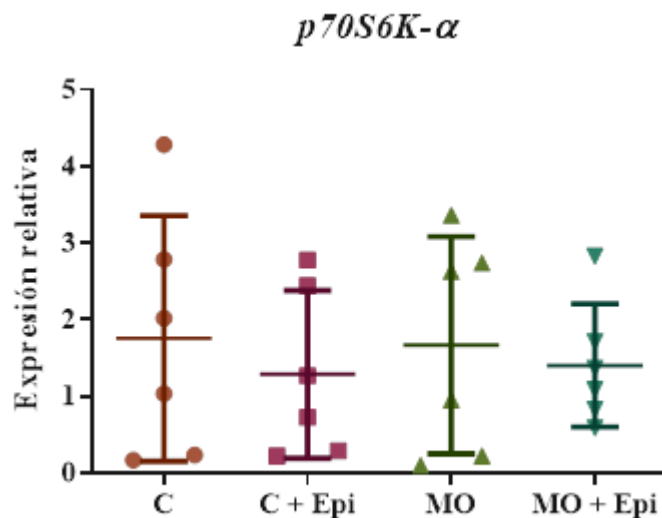


Fig. 14. Expresión relativa de *p70S6K- α* en músculo gastrocnemio. No se observaron diferencias significativas en la expresión de *p70S6K- α* en ninguno de los grupos experimentales en este músculo. A) Expresión relativa de *p70S6K- α* ARNm en músculo esquelético de gastrocnemio.

Epi = (-)-epicatequina; C = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal chow; C + Epi = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal chow intervenidas con Epi durante 13 semanas; MO = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal chow; MO + Epi = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal chow intervenidas con Epi durante 13 semanas. Los resultados están expresados como media $\pm$ desviación estándar. Resultados expresados como media $\pm$ desviación estándar. Se utilizó ANOVA de dos vías y prueba de comparaciones múltiples Tukey. n=6 ratas para cada grupo experimental.

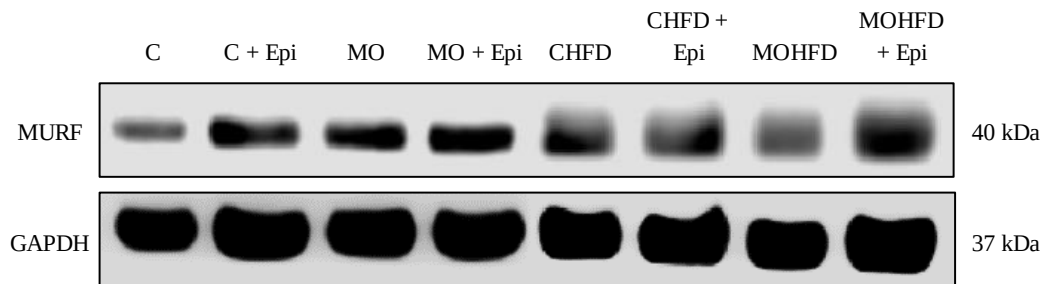
9.2. Análisis de los niveles de las proteínas relacionadas con atrofia o síntesis de proteínas musculares en el músculo gastrocnemio de los grupos experimentales a través de Western blot.

Para determinar la influencia de la dieta materna, la dieta posnatal y el tratamiento con Epi, en las proteínas inductoras de atrofia muscular, se realizó la determinación proteica de las ubiquitin ligasas MURF y MAFbx en músculo gastrocnemio de los 8 grupos experimentales, 4 grupos conformados por los descendientes macho que recibieron dieta posnatal control (C, C + Epi, MO y MO +Epi largo) y 4 grupos de ratas macho que recibieron dieta posnatal alta en grasas (CHFD, CHFD + Epi, MOHFD y MOHFD + Epi).

Se realizó un análisis de ANOVA de tres vías con el cual se determinó que los grupos con una dieta posnatal alta en grasas (CHFD, CHFD + Epi, MOHFD y MOHFD + Epi) presentan un aumento significativo en la expresión de MURF al compararse con los grupos con una dieta posnatal chow (C, C + Epi, MO, MO + Epi), esto indica que el factor de la dieta posnatal alta en grasas aumenta de manera significativa la expresión proteica de MURF ($p < 0.0001$), la dieta posnatal posee una contribución del 33.23% a la variabilidad del modelo de experimentación (Fig. 15). Además, se realizó una prueba de ANOVA de una vía, seguida de un análisis de comparaciones múltiples encontrando un aumento significativo en la expresión de esta ubiquitina ligasa en el grupo de

descendientes de madres obesas con dieta posnatal alta en grasas en comparación del grupo control (C vs MOHF) ($p = 0.047$) (Fig. 15). También es posible observar una diferencia significativa entre el grupo control y el grupo de descendientes de madres con obesidad con una dieta posnatal alta en grasas e intervenidas con el flavonoide Epi (C vs MOHFD + Epi) ($p = 0.026$) (Fig. 15).

A)



B)

Fuente de variación	% de variación total	valor de p	F (DFn, DFd)
Dieta Posnatal	33.23	<0.0001	F (1, 40) = 21.97

C)

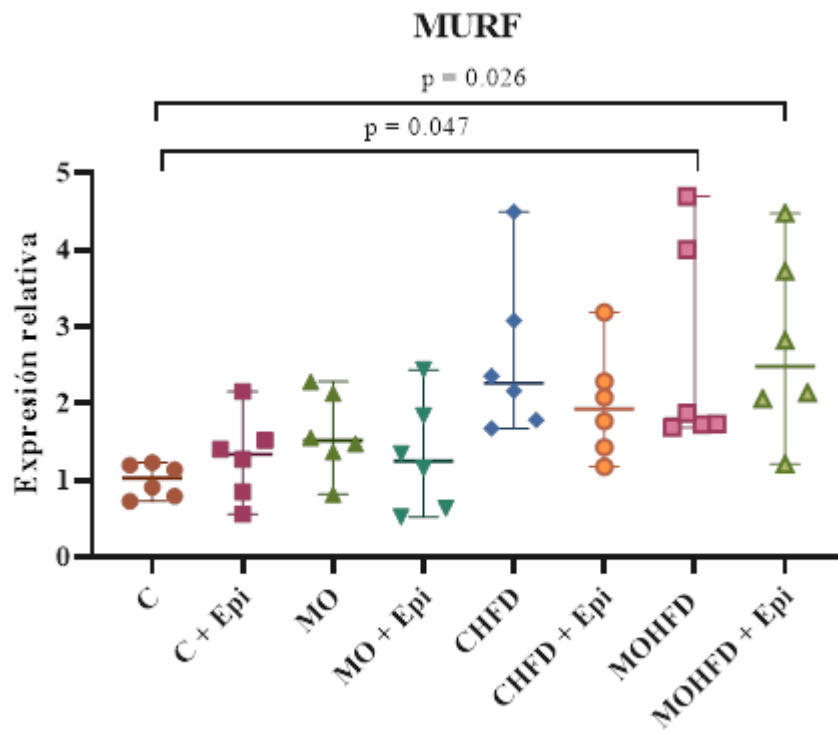
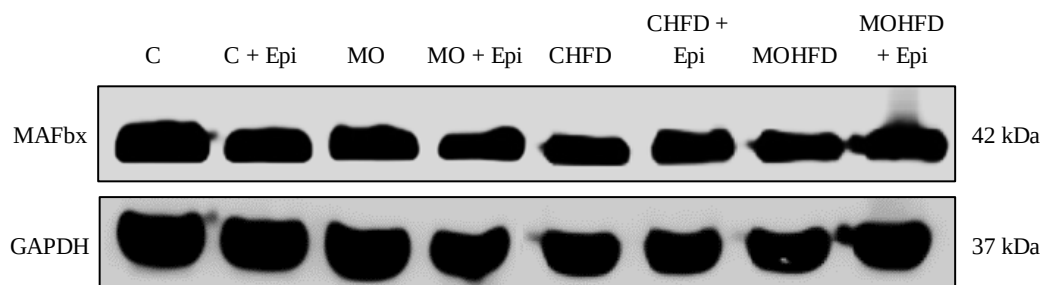


Fig. 15. Expresión relativa de la proteína de MURF en músculo gastrocnemio. Se puede observar que los grupos con una dieta posnatal alta en grasas (CHFD, CHFD + Epi, MOHFD y MOHFD + Epi) presentan un aumento en la expresión proteica de MURF en comparación con los grupos con una dieta posnatal chow (C, C + Epi, MO, MO + Epi) ($p < 0.001$). El grupo experimental MOHFD presenta un aumento significativo en la expresión de MURF en comparación con grupo C ($p = 0.047$) y la administración de Epi no disminuyó la expresión de MURF (C vs MOHFD + Epi) ($p = 0.026$) en este músculo. A) Western Blot representativo de la expresión proteica de MURF y GAPDH en los grupos experimentales. B) Resultados de la prueba ANOVA de tres vías mostrando las variables cuya influencia es significativa en el modelo de experimentación. C) Resultados del análisis por densitometría de la expresión proteica de MURF.

Epi = (-)-epicatequina; C = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal chow; C + Epi = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal chow intervenidas con Epi durante 13 semanas; MO = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal chow; MO + Epi = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal chow intervenidas con Epi durante 13 semanas; CHFD = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal alta en grasas; CHFD + Epi = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal alta en grasas intervenidas con Epi durante 13 semanas; MOHFD = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal alta en grasas; MOHFD + Epi = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal alta en grasas tratadas con Epi durante 13 semanas. Los resultados están expresados como media $\pm$ desviación estándar. Prueba ANOVA de tres vías y prueba de comparaciones múltiples Tukey. $n=6$ ratas para cada grupo experimental.

Asimismo, se realizó la cuantificación relativa de la expresión proteica de la ubiquitina ligasa MAFbx en los grupos experimentales antes mencionados. Al igual que con la proteína MURF, se observa que la dieta posnatal alta induce un aumento significativo en la expresión de MAFbx ($p = 0.010$) con una variabilidad del modelo atribuible a este factor de 14.82%.

A)



B)

Fuente de variación	% de variación total	valor de p	F (DFn, DFd)
Dieta Posnatal	14.82	0.01	F (1, 40) = 7.323

C)

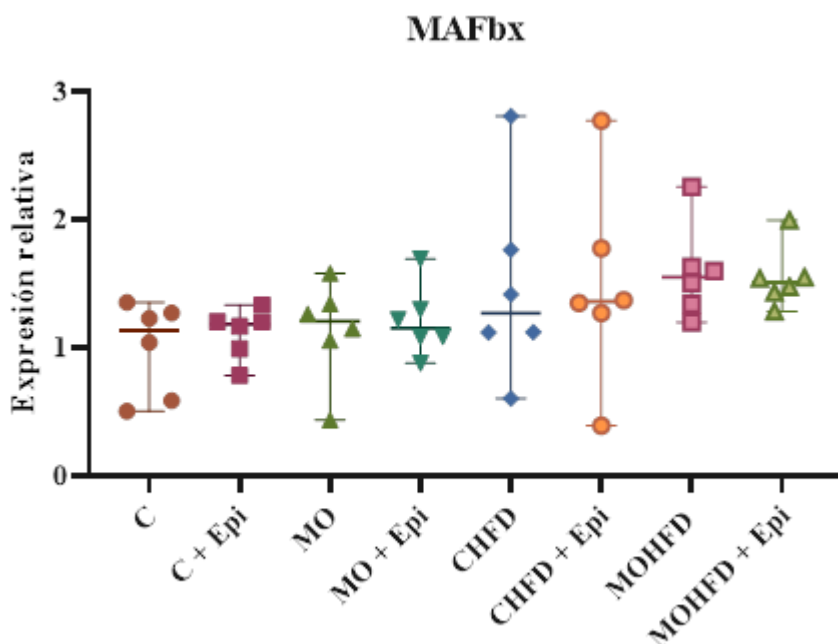
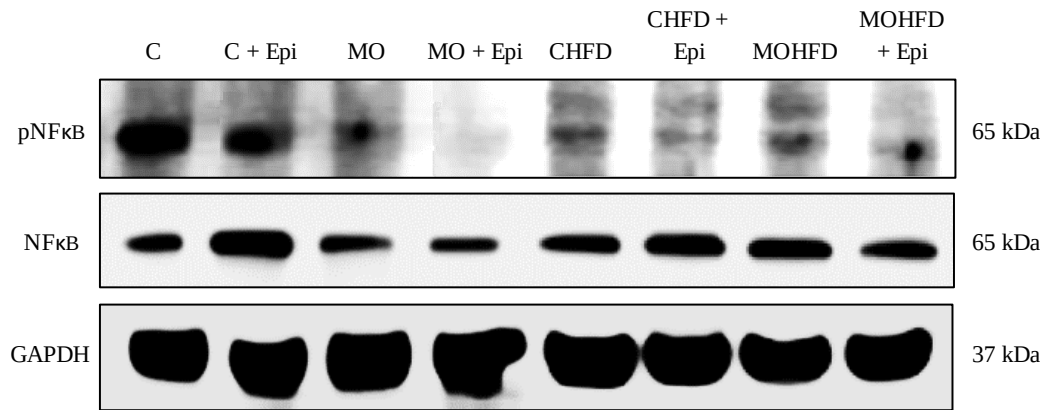


Fig. 16. Expresión relativa de la proteína de MAFbx en músculo gastrocnemio. La figura muestra que los grupos experimentales con una dieta posnatal alta en grasas (CHFD, CHFD + Epi, MOHFD y MOHFD + Epi), tienen un aumento en la expresión de MAFbx en comparación de aquellos con una dieta posnatal chow (C, C + Epi, MO, MO + Epi) ($p = 0.01$). No se observa influencia de la dieta materna ni del tratamiento con epicatequina, así como tampoco diferencias estadísticas entre los diferentes grupos de experimentación. A) Western Blot representativo de la expresión proteica de MAFbx y GAPDH en los grupos experimentales. B) Resultados de la prueba ANOVA de tres vías mostrando las variables cuya influencia es significativa en el modelo de experimentación. C) Resultados del análisis por densitometría de la expresión proteica de MAFbx.

Epi = (-)-epicatequina; C = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal chow; C + Epi = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal chow intervenidas con Epi durante 13 semanas; MO = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal chow; MO + Epi = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal chow intervenidas con Epi durante 13 semanas; CHFD = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal alta en grasas; CHFD + Epi = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal alta en grasas intervenidas con Epi durante 13 semanas; MOHFD = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal alta en grasas; MOHFD + Epi = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal alta en grasas tratadas con Epi durante 13 semanas. Los resultados están expresados como media $\pm$ desviación estándar. Prueba ANOVA de tres vías y prueba de comparaciones múltiples Tukey. n=6 ratas para cada grupo experimental.

Río arriba de estas ubiquitininas ligasas inductoras de daño muscular, se encuentra el factor de transcripción NF κ B, también relacionado con el proceso de atrofia muscular. Para determinar el impacto de las variables analizadas en la actividad de este factor, se realizó la determinación de la proteína total y de su forma fosforilada en el músculo gastrocnemio. Se observó un aumento de los niveles de NF κ B en los grupos experimentales con una dieta posnatal alta en grasas ($p = 0.0005$) con una variabilidad del 22.79% atribuible a este factor (Fig. 17). Además, encontramos un aumento en los niveles totales del factor de transcripción en el grupo con antecedente de obesidad materna y dieta posnatal alta en grasas en comparación del grupo control (C vs MOHFD) ($p = 0.018$) (Fig. 17). De igual forma, observamos un aumento en la expresión total de este factor de transcripción en el grupo con doble estímulo de dieta alta en grasas comparado con los descendientes de madres con obesidad y dieta posnatal chow (MO vs MOHFD) ($p = 0.034$) (Fig. 17). Al analizar la relación entre la proteína fosforilada y la proteína total, no se demostró contribución de alguna de las variables al modelo, o diferencias significativas entre los grupos experimentales (Fig. 17).

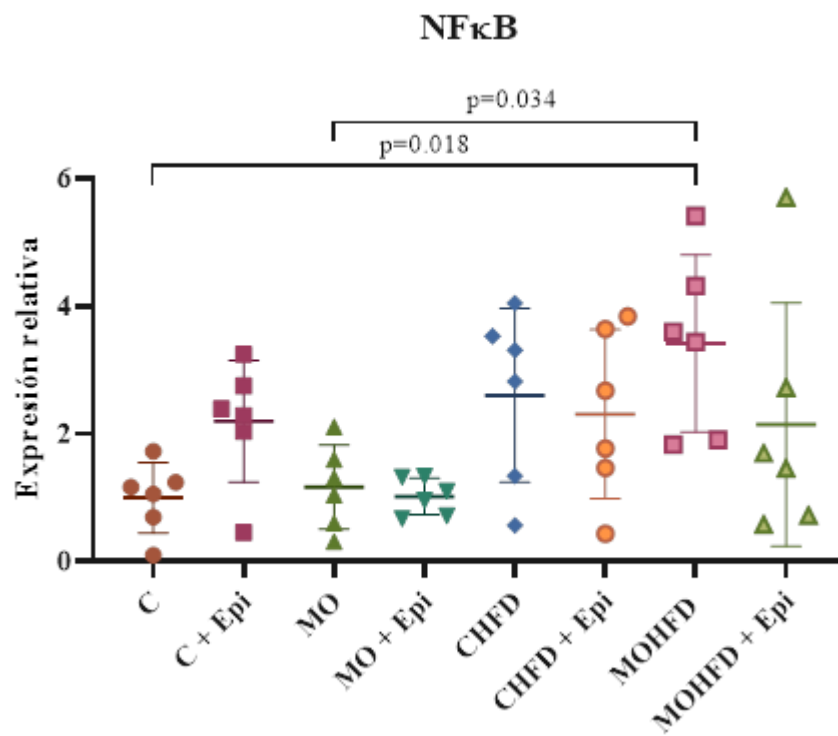
A)



B)

Fuente de variación	% de variación total	valor de p	F (DFn, DFd)
Dieta Posnatal	22.79	0.0005	F (1, 40) = 14.33

C)



D)

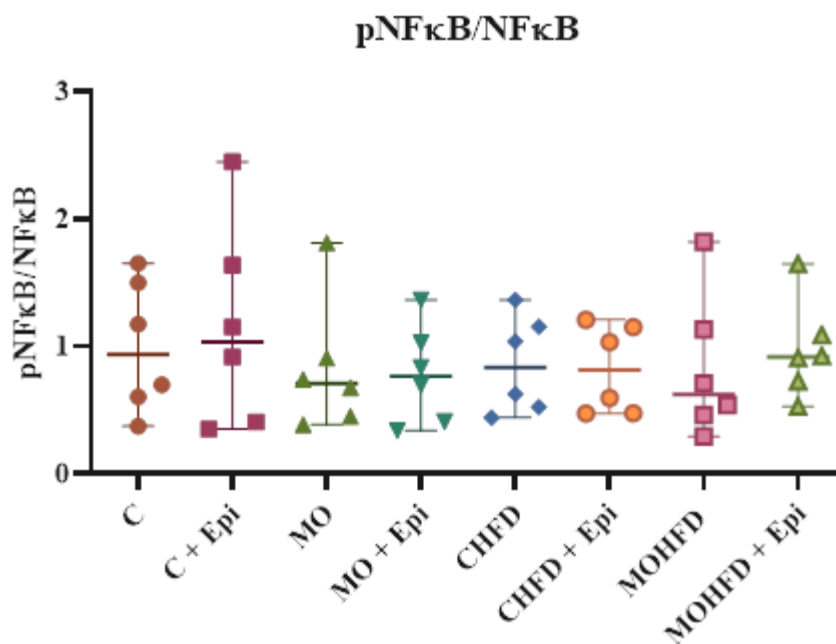


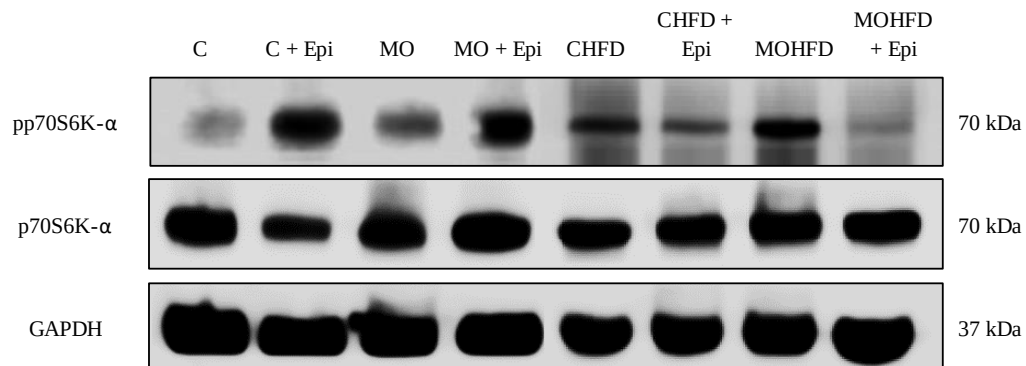
Fig. 17. Expresión relativa de la proteína total y fosforilada de NFκB en músculo gastrocnemio. Se describe un aumento significativo en la expresión de NFκB en los grupos con dieta posnatal alta en grasas (CHFD, CHFD + Epi, MOHFD y MOHFD + Epi) en comparación de los grupos con dieta posnatal chow (C, C + Epi, MO, MO + Epi), no se observaron cambios en la fosforilación de la proteína inducidos por alguna de las variables. El grupo MOHFD tiene un aumento significativo en la expresión total de NFκB contra el grupo C ($p = 0.018$), el grupo MOHFD presenta un aumento en la expresión total de NFκB en comparación del grupo MO ($p = 0.034$). No hay cambios en la fosforilación de la proteína entre grupos de experimentación. A) Western Blot representativo de la expresión de la proteína total y fosforilada de NFκB y GAPDH en los grupos experimentales. B) Resultados de la prueba ANOVA de tres vías para la expresión total de la proteína NFκB, mostrando las variables cuya influencia es significativa en el modelo de experimentación. C) Resultados del análisis por densitometría de la expresión proteica de NFκB y D) la relación entre la proteína total y fosforilada de NFκB.

Epi = (-)-epicatequina; C = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal chow; C + Epi = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal chow intervenidas con Epi durante 13 semanas; MO = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal chow; MO + Epi = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal chow intervenidas con Epi durante 13 semanas; CHFD = ratas macho descendientes de madres control

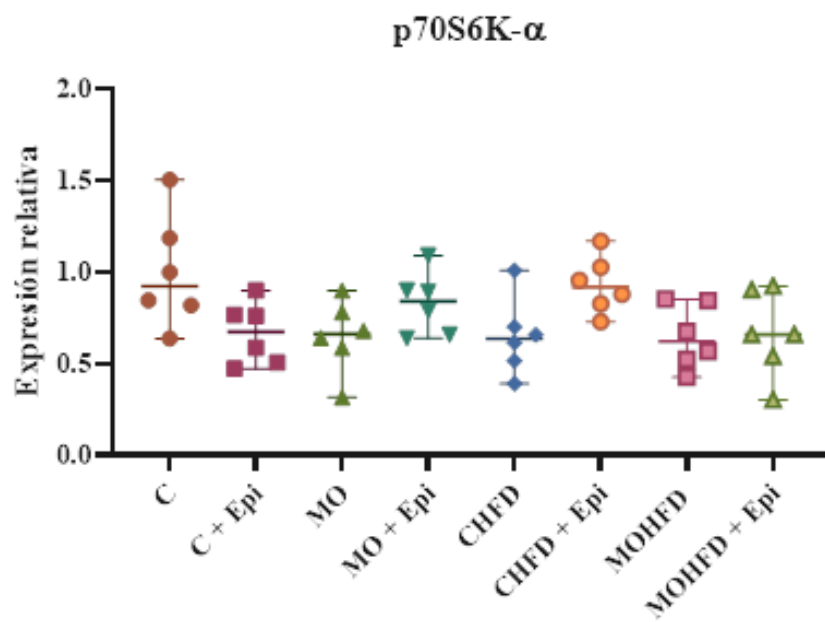
con dieta posnatal alta en grasas; CHFD + Epi = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal alta en grasas intervenidas con Epi durante 13 semanas; MOHFD = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal alta en grasas; MOHFD + Epi = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal alta en grasas tratadas con Epi durante 13 semanas. Los resultados están expresados como media $\pm$ desviación estándar. Prueba ANOVA de tres vías y prueba de comparaciones múltiples Tukey. n=6 ratas para cada grupo experimental.

Finalmente, se evaluó la expresión proteica de la cinasa p70S6K- α como proteína relacionada con la síntesis de proteína musculares en el músculo gastrocnemio de los animales de experimentación, no encontramos una influencia significativa de alguna de las tres variables sobre el modelo, tampoco diferencias significativas entre los grupos experimentales. Al analizar la relación entre la proteína fosforilada y la proteína total, tampoco se describe una influencia de las variables sobre el modelo o diferencias significativas entre los grupos experimentales (Fig. 18).

A)



B)



C)

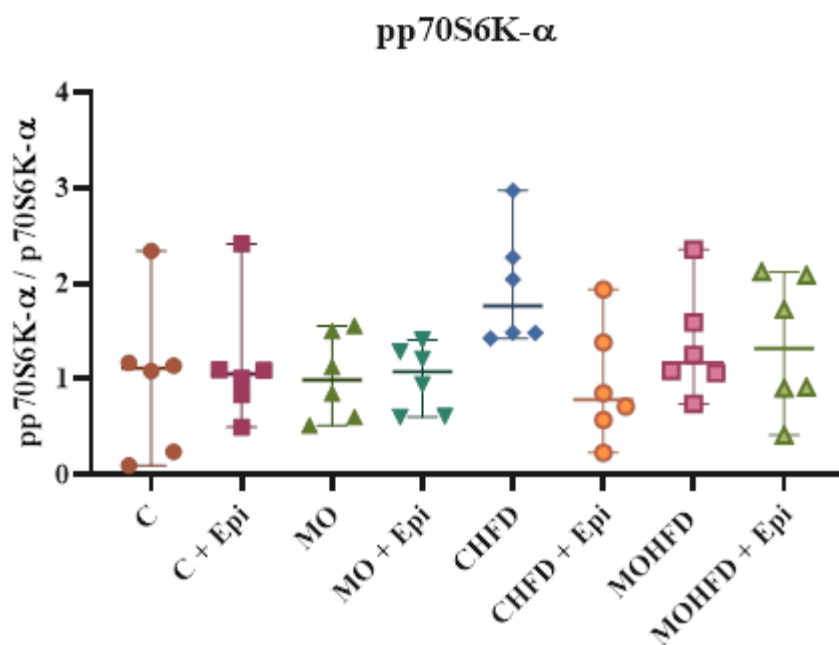


Fig. 18. Expresión relativa de la proteína total y fosforilada de p70S6K- α en músculo gastrocnemio. No se observaron diferencias significativas en la expresión de la cinasa p70S6K- α en ninguno de los grupos experimentales bajo alguna de las variables en estudio. A) Western Blot representativo de la expresión de la proteína total y fosforilada de p70S6K- α y GAPDH en los

grupos experimentales. B) Resultados del análisis por densitometría de la expresión proteica de p70S6K- α y C) la relación entre la proteína total y fosforilada de p70S6K- α .

Epi = (-)-epicatequina; C = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal chow; C + Epi = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal chow intervenidas con Epi durante 13 semanas; MO = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal chow; MO + Epi = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal chow intervenidas con Epi durante 13 semanas; CHFD = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal alta en grasas; CHFD + Epi = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal alta en grasas intervenidas con Epi durante 13 semanas; MOHFD = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal alta en grasas; MOHFD + Epi = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal alta en grasas tratadas con Epi durante 13 semanas. Los resultados están expresados como media $\pm$ desviación estándar. Prueba ANOVA de tres vías y prueba de comparaciones múltiples Tukey. n=6 ratas para cada grupo experimental.

9.3. Análisis de los niveles de las proteínas relacionadas con atrofia o síntesis de proteínas musculares en el músculo sóleo de los grupos experimentales a través de Western blot.

Se procedió al análisis de los niveles de las proteínas arriba referidas en el tejido de músculo sóleo y de igual forma, se determinó la influencia de la dieta materna, la dieta posnatal y el tratamiento con Epi en los ocho grupos experimentales antes mencionados.

Con respecto de las proteínas inductoras de atrofia muscular MURF y MAFbx, no se observó contribución de alguna de las variables estudiadas sobre la expresión de esta ubiquitina ligasa o diferencias significativas entre los grupos experimentales (Figs. 19 y 20). Sin embargo, la proteína MAFbx, presentó un aumento en los descendientes macho con dieta posnatal alta en grasas ($p = 0.0475$) con una variabilidad del modelo atribuible a este factor del 7.76% (Fig. 20). De manera interesante, al realizar al análisis de comparaciones múltiples, se observa una tendencia al aumento

de esta proteína en el grupo MOHFD en comparación del grupo control (C vs MOHFD) ($p = 0.0583$), indicando que la presencia de ambos estímulos induce un aumento significativo de MAFBx, no así la presencia de un solo estímulo deletéreo (Fig. 20).

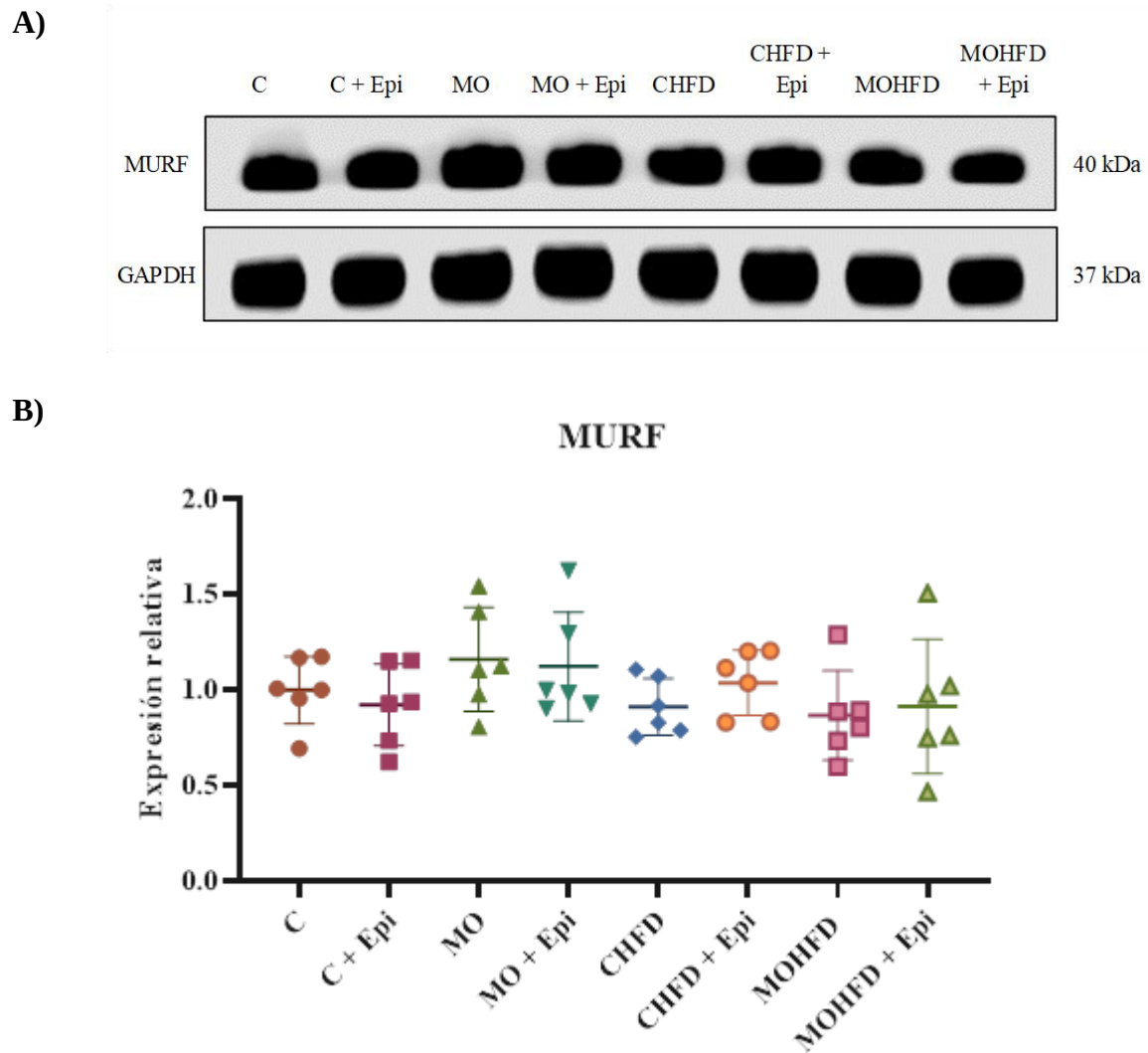
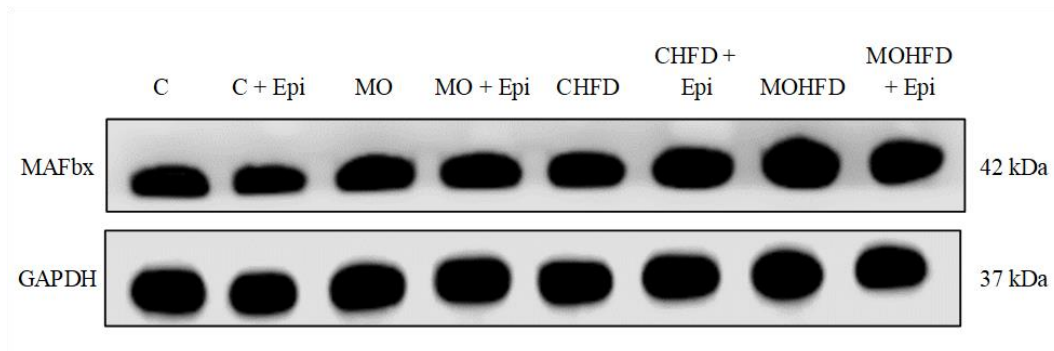


Fig. 19. Expresión relativa de la proteína MURF en músculo sóleo. La dieta materna, la dieta posnatal, o la administración de Epi no inducen cambios en la expresión proteica de MURF en músculo sóleo. A) Western Blot representativo de la expresión proteica de MURF y GAPDH en los grupos experimentales. B) Resultados del análisis por densitometría de la expresión proteica de MURF.

Epi = (-)-epicatequina; C = Ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal chow; C + Epi = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal chow intervenidas con Epi durante 13 semanas; MO = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal chow; MO + Epi = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal chow intervenidas con Epi durante 13 semanas; CHFD = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal alta en grasas; CHFD + Epi = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal alta en grasas intervenidas con Epi durante 13 semanas; MOHFD = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal alta en grasas; MOHFD + Epi = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal alta en grasas tratadas con Epi durante 13 semanas. Los resultados están expresados como media $\pm$ desviación estándar. Prueba ANOVA de tres vías y prueba de comparaciones múltiples Tukey. n=6 ratas para cada grupo experimental.

A)



B)

Fuente de variación	% de variación total	valor de p	F (DFn, DFd)
Dieta Posnatal	7.766	0.0475	F (1, 40) = 4.181

C)

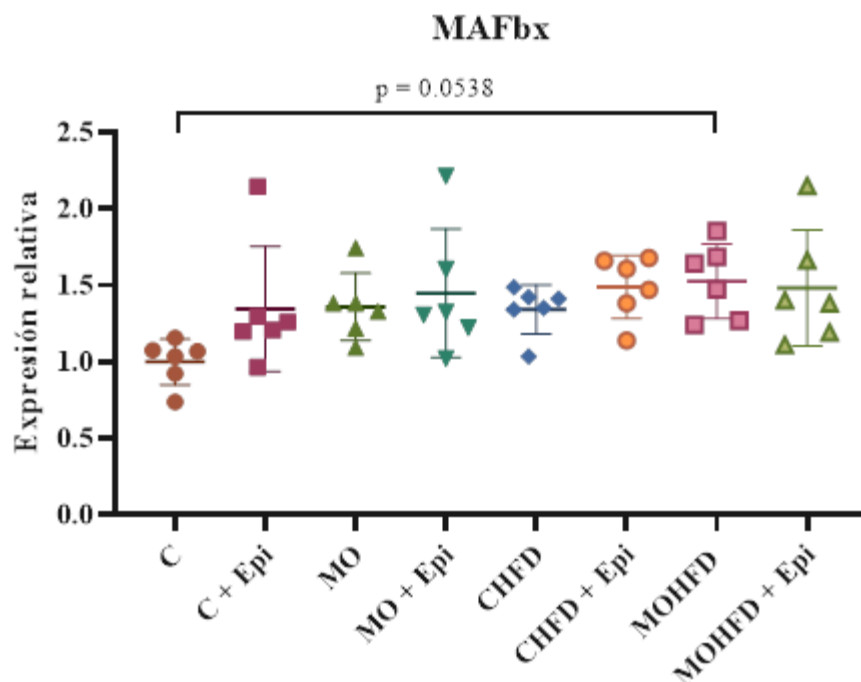


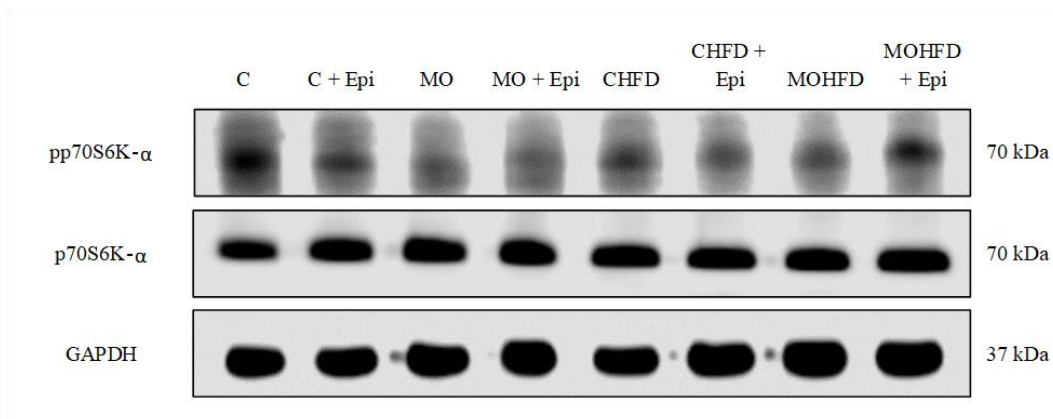
Fig. 20. Expresión relativa de la proteína de MAFbx en músculo sóleo. Los grupos con dieta posnatal alta en grasas (CHFD, CHFD + Epi, MOHFD y MOHFD + Epi) presentan un aumento significativo en la expresión proteica de MAFbx en comparación de los grupos con una dieta posnatal chow (C, C + Epi, MO, MO + Epi) ($p = 0.0475$). El grupo experimental MOHFD presenta una tendencia al aumento en la expresión de MAFbx en comparación del grupo C ($p = 0.0538$). A) Western Blot representativo de la expresión proteica de MAFbx y GAPDH en los grupos experimentales. B) Resultados de la prueba ANOVA de tres vías mostrando las variables cuya influencia es significativa en el modelo de experimentación. C) Resultados del análisis por densitometría de la expresión proteica de MAFbx.

Epi = (-)-epicatequina; C = Ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal chow; C + Epi = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal chow intervenidas con Epi durante 13 semanas; MO = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal chow; MO + Epi = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal chow intervenidas con Epi durante 13 semanas; CHFD = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal alta en grasas; CHFD + Epi = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal alta en grasas intervenidas con Epi durante 13 semanas; MOHFD = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal alta en grasas; MOHFD + Epi = ratas macho

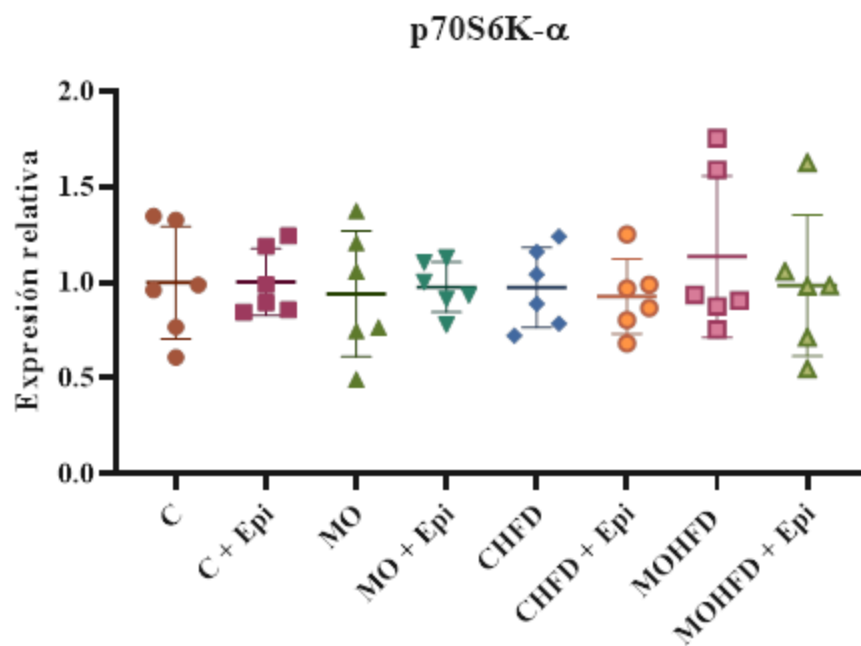
descendientes de madres obesas con dieta posnatal alta en grasas tratadas con Epi durante 13 semanas. Los resultados están expresados como media $\pm$ desviación estándar. Prueba ANOVA de tres vías y prueba de comparaciones múltiples Tukey. n=6 ratas para cada grupo experimental.

Finalmente, para evaluar el proceso de síntesis de proteína musculares, se llevó a cabo la cuantificación relativa de la proteína total de la cinasa p70S6K- α en músculo esquelético sóleo en los grupos experimentales. Similar a lo observado en músculo gastrocnemio, no se observa influencia de alguna de las tres variables sobre la variabilidad del modelo, o diferencias significativas entre los grupos experimentales. Al analizar la fosforilación de la proteína, tampoco se observó influencia de alguna de las variables en la activación de esta cinasa, ni diferencias significativas particulares entre los grupos experimentales (Fig. 21).

A)



B)



C)

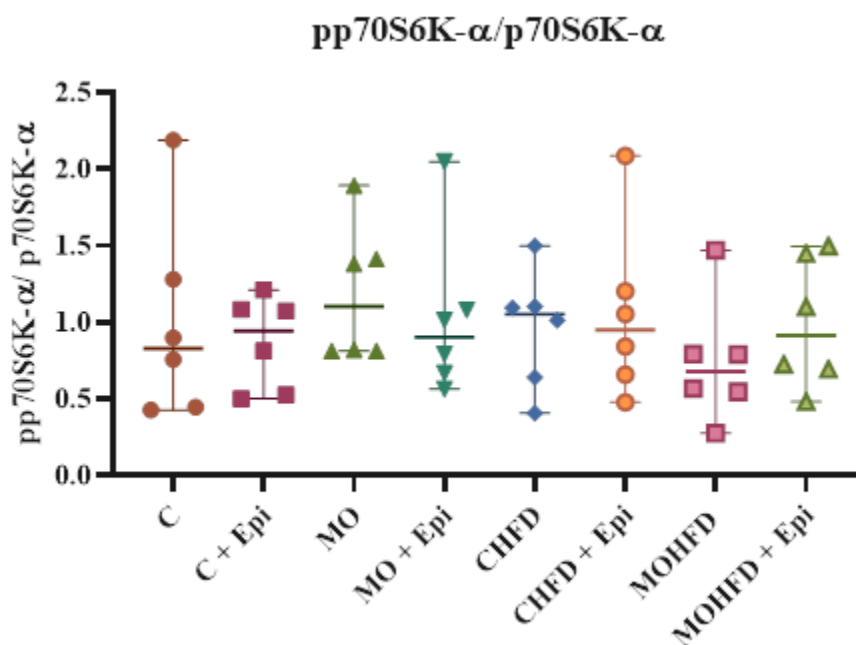


Fig. 21. Expresión relativa de la proteína total y fosforilada de p70S6K- α en músculo sóleo.

La dieta materna, la dieta posnatal alta en grasas ni el tratamiento con Epi, inducen cambios en la expresión de la cinasa p70S6K- α o su fosforilación en ninguno de los grupos experimentales. A) Western Blot representativo de la expresión de la proteína total y fosforilada de p70S6K- α y

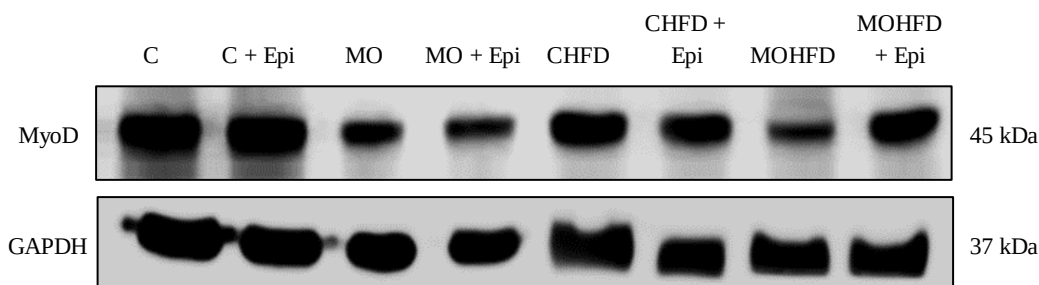
GAPDH en los grupos experimentales. B) Resultados del análisis por densitometría de la expresión proteica de p70S6K- α y C) la relación entre la proteína total y fosforilada de p70S6K- α .

Epi = (-)-epicatequina; C = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal chow; C + Epi = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal chow intervenidas con Epi durante 13 semanas; MO = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal chow; MO + Epi = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal chow intervenidas con Epi durante 13 semanas; CHFD = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal alta en grasas; CHFD + Epi = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal alta en grasas intervenidas con Epi durante 13 semanas; MOHFD = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal alta en grasas; MOHFD + Epi = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal alta en grasas tratadas con Epi durante 13 semanas. Los resultados están expresados como media $\pm$ desviación estándar. Prueba ANOVA de tres vías y prueba de comparaciones múltiples Tukey. n=6 ratas para cada grupo experimental.

9.4. Análisis de los niveles de la proteína relacionada con la diferenciación musculoesquelética en el músculo gastrocnemio y sóleo de los grupos experimentales a través de Western blot.

Finalmente, para determinar si alguna de las variables en estudio tenía influencia sobre la diferenciación muscular, se realizó la cuantificación relativa de la expresión proteica del marcador de diferenciación de músculo esquelético MyoD en los 8 grupos experimentales antes mencionados, tanto en músculo gastrocnemio (Fig. 22) como sóleo (Fig. 23). Al analizar el músculo gastrocnemio, se observa que la dieta materna obesogénica disminuye la expresión de este factor de diferenciación muscular, con una variabilidad atribuible al modelo de 15.36% ($p = 0.0061$). Por otra parte, el músculo sóleo, no mostró influencia de alguna de las 3 variables (Fig. 23).

A)



B)

Fuente de variación	% de variación total	valor de p	F (DFn, DFd)
Dieta Materna	15.36	0.0061	F (1, 40) = 8.373

C)

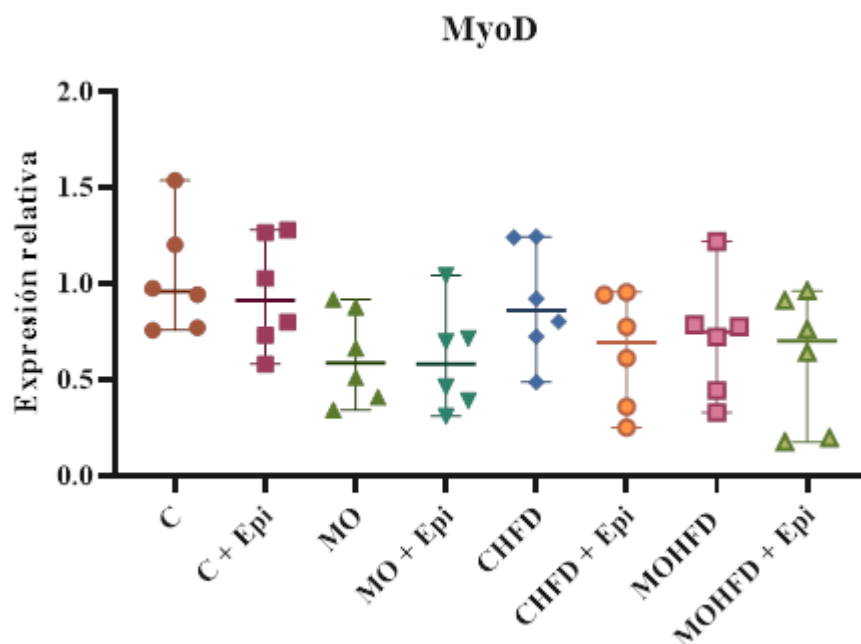
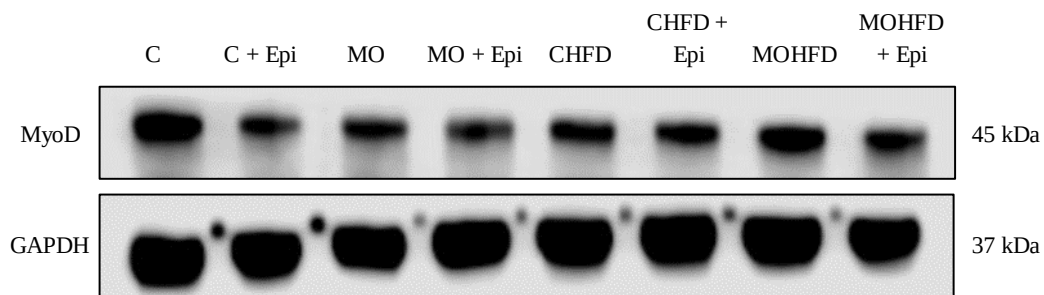


Fig. 22. Expresión relativa de la proteína MyoD en músculo gastrocnemio. Se puede observar que los grupos con dieta materna alta en grasas (MO, MO + Epi, MOHFD y MOHFD + Epi) presentan un aumento en la expresión de MyoD en comparación de los grupos con dieta materna chow (C, C + Epi, CHFD y CHFD + Epi) ($p = 0.0061$). A) Western Blot representativo de la expresión proteica de MyoD y GAPDH en los grupos experimentales. B) Resultados de la prueba ANOVA de tres vías mostrando las variables cuya influencia es significativa en el modelo de experimentación. C) Resultados del análisis por densitometría de la expresión proteica de MyoD. Epi = (-)-epicatequina; C = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal chow; C + Epi = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal chow intervenidas con

Epi durante 13 semanas; MO = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal chow; MO + Epi = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal chow intervenidas con Epi durante 13 semanas; CHFD = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal alta en grasas; CHFD + Epi = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal alta en grasas intervenidas con Epi durante 13 semanas; MOHFD = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal alta en grasas; MOHFD + Epi = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal alta en grasas tratadas con Epi durante 13 semanas. Los resultados están expresados como media $\pm$ desviación estándar. Prueba ANOVA de tres vías y prueba de comparaciones múltiples Tukey. n=6 ratas para cada grupo experimental.

A)



B)

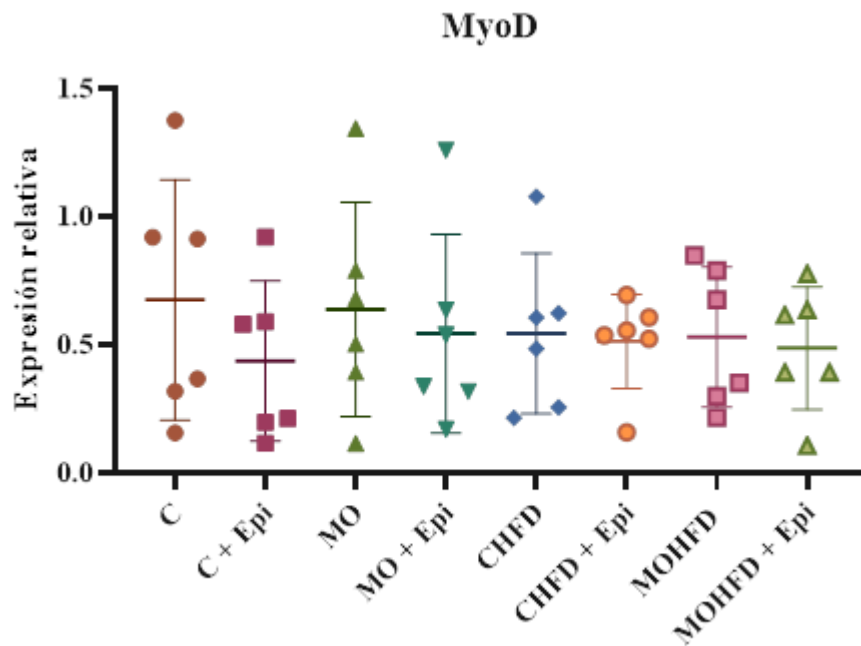


Fig. 23. Expresión relativa de la proteína de MyoD en músculo sóleo. No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los grupos experimentales. A) Western Blot representativo de la expresión proteica de MyoD y GAPDH en los grupos experimentales. B) Resultados del análisis por densitometría de la expresión proteica de MyoD.

Epi = (-)-epicatequina; C = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal chow; C + Epi = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal chow intervenidas con Epi durante 13 semanas; MO = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal chow; MO + Epi = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal chow intervenidas con Epi durante 13 semanas; CHFD = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal alta en grasas; CHFD + Epi = ratas macho descendientes de madres control con dieta posnatal alta en grasas intervenidas con Epi durante 13 semanas; MOHFD = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal alta en grasas; MOHFD + Epi = ratas macho descendientes de madres obesas con dieta posnatal alta en grasas tratadas con Epi durante 13 semanas. Los resultados están expresados como media $\pm$ desviación estándar. Prueba ANOVA de tres vías y prueba de comparaciones múltiples Tukey. n=6 ratas para cada grupo experimental.

10. DISCUSIÓN

El músculo esquelético tiene una importante capacidad de adaptación en respuesta a estímulos externos, como lo es la obesidad, que modifican el balance entre los procesos anabólicos y catabólicos; y además puede influenciar el proceso de diferenciación muscular (Egerman y Glass, 2014; Collins et al., 2016). Además, se ha informado que el músculo esquelético presenta adaptaciones características dependiente del tipo de fibra muscular (Hege et al., 1999, Shortreed et al., 2009); por ejemplo, el músculo gastrocnemio, tiene una composición de fibras mixta y el sóleo una composición de fibras predominantemente oxidativas, por lo que los efectos de la dieta alta en grasas podrían ser distintos. De tal forma, que el objetivo de nuestro estudio fue evaluar, en músculo gastrocnemio y sóleo, la expresión de genes relacionados con atrofia y síntesis de proteínas en tejido muscular esquelético de crías alimentadas con dieta control o alta en grasas e

intervenidas con el flavonoide (-)-epicatequina, descendientes de ratas Wistar controles o con obesidad inducida por dieta alta en grasa.

En nuestros resultados, observamos que la obesidad materna no tuvo influencia sobre la expresión transcripcional de la ubiquitina ligasa *Murf1* (Fig. 11), ni en su expresión proteica en músculo gastrocnemio (Fig. 15) o músculo sóleo (Fig. 19). Cabe destacar que esta ubiquitina ligasa es capaz de degradar proteínas de los filamentos gruesos del sarcómero como la proteína C de unión a miosina (MyBP-C), las cadenas ligeras de miosina 1 y 2 (MyLC1/2) y la cadena pesada de miosina (MyHC) induciendo un proceso de atrofia muscular (Cohen et al., 2008); de igual manera esta ubiquitin ligasa induce la degradación de proteínas como la sintasa de ATP mitocondrial, la cinasa de creatina citoplasmática, la piruvato deshidrogenasa y PDK2; sugiriendo la participación de MURF como regulador de procesos metabólicos además de su participación en la degradación de proteínas relacionadas a la función muscular (Witt et al., 2005; Hirner et al., 2008). Esta falta de efecto del antecedente de la obesidad materna en la expresión de MURF, podría estar relacionado con la edad de las ratas estudiadas en nuestro protocolo (110 días posnatales), la cual corresponde a una edad de adulto joven, por lo que los animales podrían aún tener en marcha mecanismos compensatorios protectores de los efectos de la obesidad materna. Esta es la primera ocasión en la que se han evaluado proteínas inductoras de atrofia muscular en un modelo de programación fetal por obesidad materna en un modelo animal equivalente a una edad de adulto joven, sin embargo, se han reportado alteraciones sistémicas y de composición corporal a esta edad de 110 días de vida posnatal (De los Santos et al., 2019), e incluso más evidentes en edades más avanzadas (450 y 650 días de vida posnatal) (Rodríguez-González et al., 2019) con el mismo modelo de programación fetal inducida por dieta materna obesogénica, por lo que, no eximimos la posibilidad de que estas alteraciones musculares puedan presentarse en etapas más avanzadas del desarrollo posnatal. Por otra parte, en otros modelos de obesidad por programación materna, se han descrito alteraciones

en algunas vías de señalización relacionadas a MURF, como una disminución en la fosforilación de Akt (De Fante et al., 2016; Campodonico-Burnett et al., 2020; Salto et al., 2020), y de mTOR en la serina 2448 (Ser2448) (Salto et al., 2020); por lo que hay indicios que esta ubiquitina ligasa pudiera verse afectada por este fenómeno, sin embargo, no se ha evaluado esta proteína de manera específica.

Por otra parte, observamos que el tratamiento con Epi indujo una disminución en la expresión de *Murf1* a nivel transcripcional (Fig. 11), en los grupos con tratamiento con el flavonoide a comparación de los grupos sin tratamiento, indicando que la administración del flavonoide podría inducir cambios transcripcionales en esta cinasa; no obstante, al analizar la expresión proteica de esta ubiquitina ligasa, no se encontraron cambios inducidos por la administración del flavonoide en alguno de los dos músculos analizados (Fig. 15, Fig. 19), lo que podría deberse a que el efecto benéfico de Epi, parece limitarse a una regulación transcripcional, sin mostrar efectos en el contenido proteico. Una posible explicación es que la falta de correlación entre la expresión transcripcional y la expresión proteica puede estar relacionada con regulación postranscripcional, traduccional y postraduccional, estabilidad de la proteína, recambio proteico, estabilidad de la proteína y requerimientos energéticos de la síntesis proteica (Maier et al., 2009; Schwanhäusser et al., 2011; Geiger et al., 2013).

Otra variable que influyó en el aumento en la expresión proteica de esta ubiquitina ligasa fue la dieta posnatal alta en grasas, induciendo un aumento en su expresión a comparar los grupos con dieta posnatal chow vs. los grupos con dieta posnatal alta en grasas en músculo gastrocnemio (Fig. 15), no así en músculo sóleo (Fig. 19). Estos resultados, son similares a lo descrito en modelos de obesidad posnatal inducida por dieta alta en grasas, en donde se ha descrito un aumento en la expresión transcripcional de MURF en músculo gastrocnemio en un modelo en ratas sometidas a una dieta alta en grasas y carbohidratos por 16 semanas (Sishi et al., 2011). Además, en el análisis

de comparaciones múltiples, se demostró que el grupo de descendiente de madres con obesidad y dieta posnatal alta en grasas (grupo MOHFD) tuvo un aumento de la expresión de MURF en comparación del grupo control (C) (Fig. 15), indicando que la presencia de ese doble estímulo (obesidad por programación + dieta alta en grasas) induce un aumento en la expresión de esta proteína. De manera interesante, este aumento significativo se mantiene en el grupo MOHFD tratado con Epi, indicando que la administración del flavonoide en este grupo experimental no es capaz de disminuir la expresión de esta ubiquitina ligasa (Fig. 15). El efecto aditivo del antecedente de obesidad materna, más una dieta posnatal alta en grasas, ha sido evaluado por otros grupos de investigación en otros sistemas diferentes al músculo esquelético, encontrando que el doble estímulo induce un aumento en la ganancia de peso corporal de los animales (Parente et al., 2008; Li et al., 2017; Hsu et al., 2020), mayor acumulación de grasa visceral (Glastras et al., 2017), alteraciones en el metabolismo de carbohidratos (Parente et al., 2008; Li et al., 2017; Glastras et al., 2017; Hsu et al., 2020), alteraciones en el tejido renal y cardíaco (Glastras et al., 2017; Tain et al., 2017b), por mencionar algunos efectos. Nuestro grupo de investigación describió previamente a través del estudio de densitometría (DXA) una disminución de la masa magra en los descendientes macho con una dieta posnatal alta en grasas, así como en el grupo con antecedente de dieta materna alta en grasas y dieta posnatal alta en grasas (De los Santos et al., 2022), poniendo de manifiesto el cambio en la composición corporales de los animales sometidos a estos estímulos, sin embargo no se analizaron las posibles vías intracelulares relacionados con la atrofia muscular. A diferencia de lo encontrado en el músculo gastrocnemio, en el músculo sóleo no se observó influencia de alguna de las variables sobre la expresión de esta ubiquitina ligasa; esto indica que la susceptibilidad es distinta en los dos tipos musculares analizados; mientras que en el músculo gastrocnemio se observaron diferencias en la expresión proteica de MURF dependientes de la dieta

alta en grasas, y la presencia de ambas dietas obesogénicas, el músculo sóleo parece ser resistente a estos estímulos deletéreos.

Se ha descrito en varios estudios que la obesidad se caracteriza por una disminución en el contenido de fibras oxidativas y un aumento en el contenido de fibras glucolíticas, y se ha informado que, en el contexto de obesidad, el músculo esquelético presenta adaptaciones características dependiente del tipo de fibra (Helge et al., 1999; Shortreed et al., 2009), por lo que es esperable que el comportamiento de ambos músculos sea distinto.

También se estudió a la ubiquitina ligasa MAFbx, la cual está relacionada con la degradación de proteínas musculares, específicamente de factores de diferenciación muscular como MyoD (factor regulador miogénico) y el factor iniciador de la transcripción eucarionte 3 subunidad f (eIF3-f) (Tintignac et al., 2005; Lagirand-Cantaloube et al., 2008). De acuerdo con lo observado en los experimentos, MAFbx no mostró diferencias en su expresión transcripcional en los grupos experimentales C, C + Epi, MO o MO + Epi (Fig. 12), y el análisis de su expresión a nivel de proteína, no mostró influencia de la obesidad materna o del flavonoide Epi sobre la expresión de esta ubiquitina ligasa en ninguno de los dos tejidos musculares. Como lo referimos previamente, hay diversos factores que podrían explicar esta falta de efecto, como es la edad de los animales y la magnitud y temporalidad de acción de este estímulo deletéreo.

Sin embargo, al analizar el efecto de la dieta posnatal alta en grasas, fue posible observar un aumento de esta proteína tanto en músculo gastrocnemio (Fig. 16) como en el sóleo (Fig. 20). Estos resultados van en línea con lo encontrado por Lee y colaboradores (2021) quienes describieron un aumento en la expresión de esta proteína secundario a una dieta posnatal alta en grasas.

De manera interesante, cuando se analizan los grupos descendientes de madres con obesidad, fue posible observar que únicamente el grupo con doble estímulo (MOHFD) tuvo una elevación en la expresión proteica de MAFbx en comparación del grupo control (C), indicando que la adición de

los dos estímulos influye sobre la expresión de esta molécula. Esta evidencia pone de manifiesto que una dieta alta en grasas sobre un modelo con antecedente de obesidad materna podría causar un proceso de atrofia muscular mediado por la ubiquitina ligasa MAFbx aún más pronunciado.

Río arriba de estas ubiquitina ligasas, podemos encontrar al factor de transcripción NFκB, descrito en los procesos proinflamatorios y la atrofia muscular, y el cual se encuentra fuertemente asociado a la sobreexpresión de MURF1. Además de inducir la transcripción de esta ubiquitina ligasa, tiene un importante rol asociado a las citocinas proinflamatorias, siendo la más destacada TNFα, la cual se encuentra elevada en el contexto de obesidad (Hotamisligil et al., 1993), quien induce su activación durante la inflamación y el estrés oxidativo en diversos tejidos, incluyendo al músculo esquelético (Bhatnagar et al., 2010; Lightfoot et al., 2015).

Al analizar la expresión de este factor de transcripción a nivel de ARNm, se observa que la dieta materna obesogénica no tiene influencia sobre la expresión de este factor, pero la administración de Epi indujo una disminución en la expresión transcripcional de NFκB (Fig. 13). Se sabe que el flavonoide –(-)epicatequina podría ejercer cierta influencia sobre la expresión y función de NFκB, de manera específica se ha demostrado que la adición de Epi en un modelo *in vitro* de adipocitos, induce una disminución en la activación de NFκB y su interacción con el ADN (Vazquez-Prieto et al., 2012); también se ha demostrado que la administración del flavonoide induce una disminución en la transcripción de NFκB en tejido endotelial en un modelo de inflamación inducida por dieta aterogénica (Morrison et al., 2013), por lo que la presencia de Epi podría regular a la baja la expresión de este factor de transcripción.

Por otra parte, se encontró un aumento de la expresión proteica total de este factor secundario a una dieta posnatal alta en grasas en el músculo gastrocnemio, al igual que en el grupo de descendientes de madres con obesidad y una dieta posnatal alta en grasas (grupo MOHFD) en

comparación del grupo control (grupo C) (Fig. 17), indicando que la presencia de ambos estímulos, no así de uno sólo, induce un aumento pronunciado en la expresión de esta molécula. Algunos estudios han descrito un aumento en la abundancia y activación de este factor de transcripción tras una dieta alta en grasas en ratas (Sishi et al., 2011), así como un aumento en la señalización mediada por NF κ B en estudios *in vitro* en miotubos sometidos a un exceso de sustratos energéticos (Nisr et al., 2019), indicando que la obesidad podría inducir una activación de este factor en músculo esquelético. Aunque estos resultados parecen interesantes y en línea con los publicado en cuando a NF- κ B y las dietas obesogénicas, al realizar el análisis de los niveles de fosforilación de la proteína, no se observan diferencias significativas entre los grupos, indicando que, aunque los niveles totales del factor de transcripción cambian con la presencia de estos estímulos, su actividad como factor de transcripción no es regulada mediante estas variables estudiadas.

Por otro lado, la cinasa p70S6 (p70s6K) se relaciona con la síntesis de proteínas musculares y el proceso de generación de nuevas fibras musculares, asimismo, esta proteína cuya activación es inducida por el eje PI3K/Akt/mTOR, es necesaria para que las fibras musculares alcancen su tamaño habitual (Egerman y Glass, 2014). En cuanto a su función específica, p70S6K fosforila a la proteína ribosomal S6, induciendo la síntesis de proteínas en el ribosoma, lo que puede contribuir al mantenimiento de la masa muscular.

Con respecto a nuestros resultados de la cinasa p70S6 (p70s6K), no encontramos cambios a nivel de ARNm o a nivel de proteínas en los dos músculos de los grupos experimentales, así como tampoco influencia de la obesidad materna o tratamiento con Epi largo (Figs. 18 y 21).

Se han descrito alteraciones en la expresión de esta cinasa en el contexto de obesidad, pero la evidencia resulta diversa. Algunos autores no han encontrado alteraciones en la activación de esta cinasa en el contexto de obesidad (Beals et al, 2019), mientras que otros, como Um y colaboradores (2004) han determinado que p70S6K podría encontrarse hiperactivo en condiciones basales en

músculo esquelético de ratones con obesidad, induciendo una regulación negativa sobre la señalización de la insulina por inhibición de IRS1 río arriba (Um et al., 2004). De igual manera, en humanos con obesidad y diabetes, se observa una sobreactivación de p70S6K en condiciones basales, aunque una disminución en la actividad de la cinasa al ser estimulada por insulina (Williamson et al., 2015), lo que indica que en condiciones de obesidad podría encontrarse un aumento en la fosforilación de esta molécula, lo que induce cierta afectación en la señalización de la insulina mediada por IRS1. Esta evidencia parece sustentar que la modulación de la cinasa p70S6K puede llevarse a cabo mediante diversos estímulos, por lo que los resultados descritos en este modelo no parecen concluyentes.

Finalmente se analizó el factor de diferenciación muscular MyoD, el cual se encuentra disminuido en el músculo gastrocnemio frente al estímulo de una dieta materna alta en grasas (Fig. 22), de manera interesante, su expresión no se ve afectada por la presencia de una dieta posnatal alta en grasas ni por el tratamiento con el flavonoide Epi. Este hallazgo podría indicar que frente al estímulo deletéreo *in útero*, las moléculas particularmente involucradas con la organogénesis y diferenciación de músculo esquelético podrían ser las más afectadas. Se ha descrito que MyoD juega un papel fundamental tanto en la diferenciación de células satélites a miocitos en la vida adulta (Pavlati et al., 2003; Karalaki et al., 2009) como en la miogénesis durante el periodo embrionario (Wood et al., 2013), por lo que parece atractivo pensar que la obesidad materna es capaz de afectar sobre todo las moléculas con un importante papel en esta ventana del desarrollo. Por otra parte, en músculo sóleo, no se observan cambios en la expresión de MyoD secundario a ninguno de los tres estímulos presentados (Fig. 23), indicando nuevamente las diferencias entre los procesos adaptativos de ambos músculos.

El presente estudio tiene limitaciones que incluyen el estudio de una sola edad de animales, la cual, como se ha mencionado anteriormente, corresponde a una edad de adulto joven por lo que aún

podrían existir mecanismos compensatorios de regulación metabólica y estructural en el tejido de músculo esquelético. Por otra parte, debido a la contingencia sanitaria por COVID-19, no fue posible evaluar la expresión transcripcional de los genes en estudio en los grupos experimentales CHFD, CHFD + Epi, MOHFD ni MOHFD + Epi, para el caso del músculo gastrocnemio, ni la evaluación transcripcional de los grupos experimentales C, C + Epi, MO, MO + Epi, CHFD, CHFD + Epi, MOHFD ni MOHFD + Epi en músculo sóleo. De igual forma, no se pudieron analizar las características histológicas de los músculos, debido a la pérdida de los tejidos.

Por otra parte, tuvimos ciertas dificultades para evaluar la activación mediada por fosforilación del factor de transcripción NFκB en músculo sóleo, lo anterior debido a la estabilidad de los grupos fosfato en las muestras de músculo esquelético, por lo que los resultados de este músculo no cumplieron con la calidad deseada y se decidieron no incluir en el presente trabajo.

Finalmente, es importante mencionar que se trabajó con un protocolo de tratamiento largo con Epi (90 días), el cual es un esquema diferente en comparación a la mayoría de los estudios en la literatura que utilizan un tratamiento con Epi de 15 días, por lo que la respuesta a este esquema podría no haber sido tan eficaz, llevándonos a hipotetizar que el efecto de la –(-)epicatequina en el presente modelo de estudio, podría ser dependiente del tiempo de administración del flavonoide y diferir de los resultados hasta ahora descritos en músculo esquelético.

11. RESUMEN DE RESULTADOS

La obesidad materna no modificó la expresión transcripcional ni proteica de la ubiquitina ligasa Murf1, sin embargo, la dieta posnatal alta en grasas indujo un aumento significativo en su expresión en músculo gastrocnemio; este aumento se observó aún más pronunciado en las crías de MO.

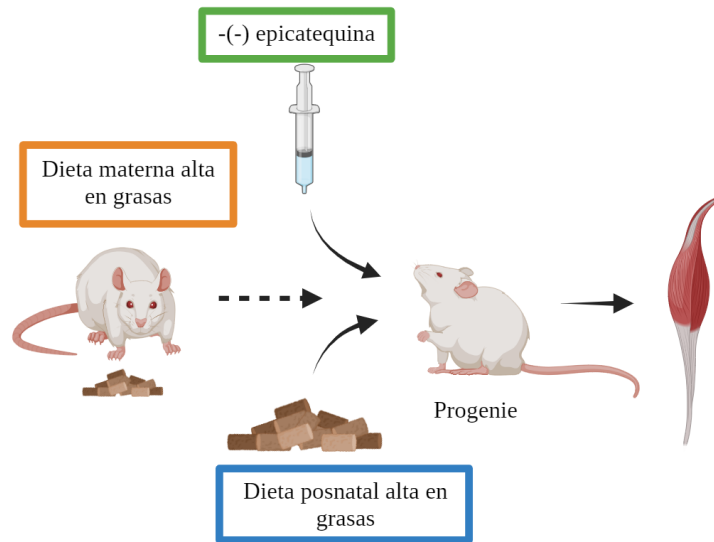
Se demostró que el grupo con doble estímulo (dieta materna obesogénica acompañada de una dieta posnatal alta en grasas). Por otra parte, la Epi ejerce un efecto a nivel transcripcional, al disminuir la expresión de *Murf1*, sin embargo, no se observa el mismo efecto al analizar la expresión de la proteína.

No encontramos diferencias en la expresión a nivel de ARNm de MAFbx en músculo gastrocnemio o sóleo en los descendientes macho obesos por programación. Sin embargo, la dieta posnatal alta en grasas indujo un aumento en la expresión proteica de este factor, tanto en músculo gastrocnemio como sóleo; y de manera particular en éste último, la combinación del doble estímulo (obesidad por programación + dieta alta en grasas) aumentó la expresión a nivel proteico de MAFbx, de manera importante. Para el caso de esta molécula, el tratamiento con Epi no indujo cambios en su expresión.

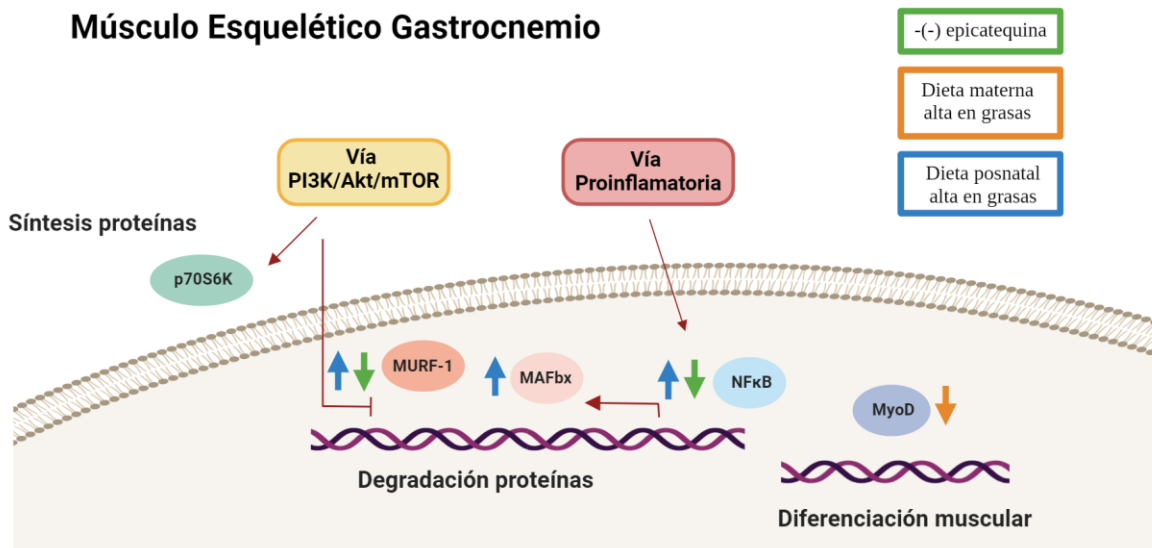
El análisis de la expresión de NFκB, demostró un aumento de la proteína total secundario a una dieta posnatal alta en grasas en músculo gastrocnemio, pero no en su forma fosforilada. A nivel transcripcional, la Epi disminuyó la expresión de este factor de transcripción. La expresión transcripcional o proteica de la cinasa p70S6K no se modificó en ninguno de los grupos experimentales.

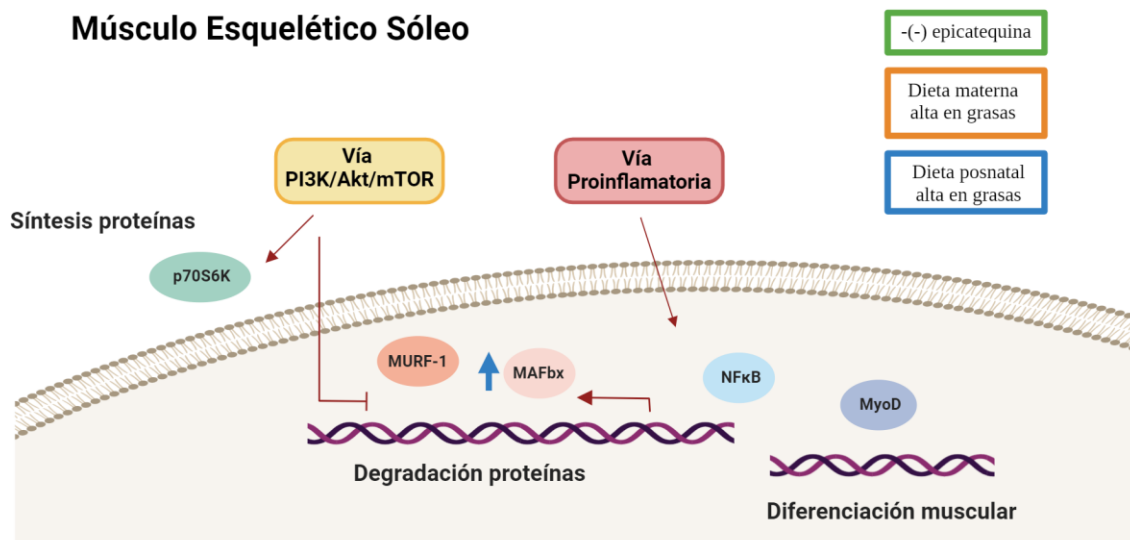
El factor de diferenciación muscular MyoD, mostró una disminución de su expresión secundario a la presencia de una dieta materna obesogénica en músculo gastrocnemio, pero no en el músculo sóleo.

12. RESUMEN GRÁFICO DE RESULTADOS



Músculo Esquelético Gastrocnemio





Se utilizó un modelo animal con ratas macho Wistar provenientes de madres control o con dieta alta en grasas; durante la vida posnatal fueron alimentadas con una dieta control o alta en grasas y se evaluó la administración de Epi durante 13 semanas posteriores al destete.

En músculo gastrocnemio, se demostró que la administración de Epi durante 13 semanas indujo una disminución en la expresión transcripcional de *Murf1* y *NF-κB*. En este mismo músculo, la dieta posnatal alta en grasas indujo un aumento en la expresión proteica de MURF, MAFbx y NFκB total; por otra parte, la dieta materna alta en grasas indujo una disminución en la expresión proteica del factor de diferenciación muscular MyoD. En músculo gastrocnemio no se observaron cambios en la expresión de la cinasa inductora de hipertrofia muscular p70S6K-α.

En músculo sóleo, la dieta posnatal alta en grasas indujo un aumento en la expresión de MAFbx, sin embargo la proteína MURF, p70S6K-α, ni MyoD presentaron cambios secundarios a la presencia de alguna de las 3 variables en estudio.

13. CONCLUSIONES

La administración del flavonoide Epi es capaz de inducir una disminución a nivel transcripcional en la expresión de los inductores de atrofia muscular *Murf1* y *NFκB*, indicando un potencial papel benéfico en la reducción del fenómeno de atrofia muscular. Al analizar la influencia del factor de la obesidad materna, se observa que ésta es capaz de disminuir la expresión proteica del factor de diferenciación muscular MyoD, poniendo de manifiesto que el ambiente obesogénico in útero podría modular la diferenciación muscular posnatal. Por otra parte, la dieta posnatal alta en grasas ocasiona un aumento en la expresión de las proteínas MURF1 y MAFbx, relacionadas con la atrofia musculoesquelética, la cual podría estar relacionada con el fenómeno de obesidad posnatal. Finalmente, la expresión proteica de p70S6K- α cinasa relacionada con la hipertrofia muscular, no fue modificada por alguna de las variables estudiadas en el modelo.

14. PERSPECTIVAS

En el presente estudio evaluamos genes y proteínas relacionados con la atrofia y la hipertrofia no patológica del músculo esquelético, sin embargo, las vías de señalización que conducen a la modificación de las moléculas estudiadas son diversas, por lo que sería de interés explorar río arriba, las cascadas de señalización que son principalmente moduladas por nuestras variables de estudio y que pueden conducir a las modificaciones observadas en MURF, MAFbx, NFκB, p70S6K- α y MyoD.

De igual manera, decidimos evaluar una edad joven de ratas para determinar el efecto de estas variables, sin embargo, será interesante evaluar estas moléculas en una edad más avanzada de los animales, con el propósito de determinar si con el proceso natural de envejecimiento, el efecto potencialmente deletéreo de las dietas obesogénicas (materna o posnatal) tiene un efecto más pronunciado sobre el tejido musculoesquelético.

Finalmente, resulta de relevancia considerar evaluar un periodo corto de administración de –(-) epicatequina, por ejemplo, de 2 semanas, el cual ha sido abundantemente descrito y podría determinar si un tratamiento corto bajo las mismas condiciones de estudio presenta efectos distintos a los observados con una administración larga del flavonoide.

15. TABLAS SUPLEMENTARIAS

Tabla 1. Resultados estadísticos de la expresión transcripcional relativa a β actina en músculo gastrocnemio de los genes A) *Murf1*, B) *MAFbx*, C) *NFκB* y D) *p70S6K-α* mediante la prueba ANOVA de dos vías. Se evaluaron las variables dieta materna y tratamiento con Epi durante 90 días.

A)

Fuente de variación	% de variación total	valor de p	F (DFn, DFd)
Dieta Materna	15.6	0.042	F (1, 20) = 4.699
Tratamiento Epi	16.83	0.036	F (1, 20) = 5.068
Dieta Materna x Tratamiento Epi	1.149	0.563	F (1, 20) = 0.3460

B)

Fuente de variación	% de variación total	valor de p	F (DFn, DFd)
Dieta Materna	2.159	0.4712	F (1, 20) = 0.5393
Tratamiento Epi	13.45	0.0817	F (1, 20) = 3.361
Dieta Materna x Tratamiento Epi	4.32	0.3113	F (1, 20) = 1.079

C)

Fuente de variación	% de variación total	valor de p	F (DFn, DFd)
Dieta Materna	0.9452	0.6306	F (1, 20) = 0.2385
Tratamiento Epi	19.59	0.0379	F (1, 20) = 4.942
Dieta Materna x Tratamiento Epi	0.1956	0.8265	F (1, 20) = 0.04934

D)

Fuente de variación	% de variación total	valor de p	F (DFn, DFd)
Dieta Materna	0.003491	0.9789	F (1, 20) = 0.0007170
Tratamiento Epi	2.431	0.488	F (1, 20) = 0.4992
Dieta Materna x Tratamiento Epi	0.1886	0.8459	F (1, 20) = 0.03874

Tabla 2. Resultados estadísticos de la expresión proteica relativa a GAPDH en músculo gastrocnemio de las proteínas A) MURF, B) MAFbx, C) NFκB, D) pNFκB / NFκB, E) p70S6K-α y F) pp70S6K-α/ p70S6K-α mediante la prueba ANOVA de tres vías. Se evaluaron las variables dieta materna, dieta posnatal y tratamiento con Epi durante 90 días.

A)

Fuente de variación	% de variación total	valor de p	F (DFn, DFd)
Dieta Materna	2.971	0.1688	F (1, 40) = 1.964
Dieta Posnatal	33.23	<0.0001	F (1, 40) = 21.97
Tratamiento Epi	0.3371	0.6395	F (1, 40) = 0.2228
Dieta Materna x Dieta Posnatal	0.02826	0.892	F (1, 40) = 0.01869
Dieta Materna x Tratamiento Epi	0.03021	0.8883	F (1, 40) = 0.01997
Dieta Posnatal x Tratamiento Epi	0.367	0.625	F (1, 40) = 0.2426
Dieta Materna x Dieta Posnatal x Tratamiento Epi	2.53	0.2034	F (1, 40) = 1.672

B)

Fuente de variación	% de variación total	valor de p	F (DFn, DFd)
Dieta Materna	2.76	0.2498	F (1, 40) = 1.364
Dieta Posnatal	14.82	0.01	F (1, 40) = 7.323
Tratamiento Epi	0.01362	0.935	F (1, 40) = 0.006732
Dieta Materna x Dieta Posnatal	0.5283	0.6122	F (1, 40) = 0.2611
Dieta Materna x Tratamiento Epi	0.687	0.5633	F (1, 40) = 0.3396
Dieta Posnatal x Tratamiento Epi	0.0002076	0.992	F (1, 40) = 0.0001026
Dieta Materna x Dieta Posnatal x Tratamiento Epi	0.2672	0.7182	F (1, 40) = 0.1321

C)

Fuente de variación	% de variación total	valor de p	F (DFn, DFd)
Dieta Materna	0.1112	0.7928	F (1, 40) = 0.06994

Dieta Posnatal	22.79	0.0005	$F(1, 40) = 14.33$
Tratamiento Epi	0.2343	0.7031	$F(1, 40) = 0.1474$
Dieta Materna x Dieta Posnatal	2.44	0.2226	$F(1, 40) = 1.535$
Dieta Materna x Tratamiento Epi	4.704	0.0932	$F(1, 40) = 2.959$
Dieta Posnatal x Tratamiento Epi	6.007	0.059	$F(1, 40) = 3.779$
Dieta Materna x Dieta Posnatal x Tratamiento Epi	0.1198	0.7852	$F(1, 40) = 0.07532$

D)

Fuente de variación	% de variación total	valor de p	F (DFn, DFd)
Dieta Materna	1.269	0.4665	$F(1, 40) = 0.5405$
Dieta Posnatal	0.5492	0.6312	$F(1, 40) = 0.2340$
Tratamiento Epi	0.3043	0.7207	$F(1, 40) = 0.1296$
Dieta Materna x Dieta Posnatal	2.979	0.2666	$F(1, 40) = 1.269$
Dieta Materna x Tratamiento Epi	0.003531	0.9693	$F(1, 40) = 0.001504$
Dieta Posnatal x Tratamiento Epi	0.0007762	0.9856	$F(1, 40) = 0.0003307$
Dieta Materna x Dieta Posnatal x Tratamiento Epi	1.006	0.5165	$F(1, 40) = 0.4285$

E)

Fuente de variación	% de variación total	valor de p	F (DFn, DFd)
Dieta Materna	5.877	0.0671	$F(1, 40) = 3.542$
Dieta Posnatal	1.809	0.3027	$F(1, 40) = 1.090$
Tratamiento Epi	0.605	0.5493	$F(1, 40) = 0.3646$
Dieta Materna x Dieta Posnatal	0.1937	0.7344	$F(1, 40) = 0.1167$
Dieta Materna x Tratamiento Epi	1.743	0.3115	$F(1, 40) = 1.051$
Dieta Posnatal x Tratamiento Epi	5.966	0.0652	$F(1, 40) = 3.596$
Dieta Materna x Dieta Posnatal x Tratamiento Epi	17.44	0.0024	$F(1, 40) = 10.51$

F)

Fuente de variación	% de variación total	valor de p	F (DFn, DFd)
---------------------	----------------------	------------	--------------

Dieta Materna	0.4012	0.6492	F (1, 40) = 0.2101
Dieta Posnatal	7.521	0.0541	F (1, 40) = 3.939
Tratamiento Epi	2.824	0.2311	F (1, 40) = 1.479
Dieta Materna x Dieta Posnatal	0.01161	0.9382	F (1, 40) = 0.006082
Dieta Materna x Tratamiento Epi	2.762	0.2362	F (1, 40) = 1.446
Dieta Posnatal x Tratamiento Epi	4.799	0.1208	F (1, 40) = 2.513
Dieta Materna x Dieta Posnatal x Tratamiento Epi	5.302	0.1034	F (1, 40) = 2.777

Tabla 3. Resultados estadísticos de la expresión proteica relativa a GAPDH en músculo sóleo de las proteínas A) MURF, B) MAFbx, C) p70 y D) pP70/p70 mediante la prueba ANOVA de tres vías. Se evaluaron las variables dieta materna, dieta posnatal y tratamiento con Epi durante 90 días.

A)

Fuente de variación	% de variación total	valor de p	F (DFn, DFd)
Dieta Materna	1.01	0.4882	F (1, 40) = 0.4895
Dieta Posnatal	6.076	0.094	F (1, 40) = 2.944
Tratamiento Epi	0.08903	0.8365	F (1, 40) = 0.04313
Dite Materna x Dieta Posnatal	7.584	0.0624	F (1, 40) = 3.674
Dieta Materna x Tratamiento Epi	0.03998	0.89	F (1, 40) = 0.01937
Dieta Posnatal x Tratamiento Epi	2.248	0.303	F (1, 40) = 1.089
Dieta Materna x Dieta Posnatal x Tratamiento Epi	0.3814	0.6696	F (1, 40) = 0.1848

B)

Fuente de variación	% de variación total	valor de p	F (DFn, DFd)
Dieta Posnatal	7.766	0.0475	F (1, 40) = 4.181
Tratamiento Epi	4.733	0.1183	F (1, 40) = 2.548
Dite Materna x Dieta Posnatal	1.319	0.4044	F (1, 40) = 0.7102
Dieta Materna x Tratamiento Epi	3.312	0.1893	F (1, 40) = 1.783
Dieta Posnatal x Tratamiento Epi	1.81	0.3296	F (1, 40) = 0.9743
Dieta Materna x Dieta Posnatal x Tratamiento Epi	0.06672	0.8506	F (1, 40) = 0.03592

C)

Fuente de variación	% de variación total	valor de p	F (DFn, DFd)
Dieta Materna	0.3983	0.6843	F (1, 40) = 0.1677
Dieta Posnatal	0.2253	0.7597	F (1, 40) = 0.09489
Tratamiento Epi	0.5547	0.6315	F (1, 40) = 0.2336
Dieta Materna x Dieta Posnatal	2.077	0.3552	F (1, 40) = 0.8749
Dieta Materna x Tratamiento Epi	0.1162	0.826	F (1, 40) = 0.04895
Dieta Posnatal x Tratamiento Epi	1.24	0.474	F (1, 40) = 0.5224
Dieta Materna x Dieta Posnatal x Tratamiento Epi	0.4188	0.6767	F (1, 40) = 0.1764

D)

Fuente de variación	% de variación total	valor de p	F (DFn, DFd)
Dieta Materna	0.03503	0.9027	F (1, 40) = 0.01514
Dieta Posnatal	0.8707	0.5431	F (1, 40) = 0.3762
Tratamiento Epi	0.0208	0.9249	F (1, 40) = 0.008988
Dieta Materna x Dieta Posnatal	3.021	0.26	F (1, 40) = 1.305
Dieta Materna x Tratamiento Epi	0.122	0.8196	F (1, 40) = 0.05270
Dieta Posnatal x Tratamiento Epi	3.1	0.254	F (1, 40) = 1.340
Dieta Materna x Dieta Posnatal x Tratamiento Epi	0.2611	0.7387	F (1, 40) = 0.1128

Tabla 4. Resultados estadísticos de la expresión proteica relativa a GAPDH en músculo A) gastrocnemio y B) sóleo de la proteína MyoD mediante la prueba ANOVA de tres vías. Se evaluaron las variables dieta materna, dieta posnatal y tratamiento con Epi durante 90 días.

A)

Fuente de variación	% de variación total	valor de p	F (DFn, DFd)
Dieta Materna	15.36	0.0061	F (1, 40) = 8.373
Dieta Posnatal	1.698	0.3418	F (1, 40) = 0.9257
Tratamiento Epi	3.336	0.1851	F (1, 40) = 1.818

Dieta Materna x Dieta Posnatal	4.329	0.1324	F (1, 40) = 2.359
Dieta Materna x Tratamiento Epi	0.7383	0.5295	F (1, 40) = 0.4024
Dieta Posnatal x Tratamiento Epi	1.04	0.4558	F (1, 40) = 0.5671
Dieta Materna x Dieta Posnatal x Tratamiento Epi	0.1078	0.8097	F (1, 40) = 0.05874

B)

Fuente de variación	% de variación total	valor de p	F (DFn, DFd)
Dieta Materna	0.01283	0.9417	F (1, 40) = 0.005418
Dieta Posnatal	0.7514	0.5764	F (1, 40) = 0.3173
Tratamiento Epi	2.599	0.3011	F (1, 40) = 1.097
Dieta Materna x Dieta Posnatal	0.1886	0.7792	F (1, 40) = 0.07964
Dieta Materna x Tratamiento Epi	0.2759	0.7347	F (1, 40) = 0.1165
Dieta Posnatal x Tratamiento Epi	1.058	0.5077	F (1, 40) = 0.4468
Dieta Materna x Dieta Posnatal x Tratamiento Epi	0.3846	0.6891	F (1, 40) = 0.1624

16. REFERENCIAS

1. Abate M, Schiavone C, Salini V, Andia I. Occurrence of tendon pathologies in metabolic disorders. *Rheumatology (Oxford)*. 2013 Apr;52(4):599–608.
2. Adams GR, McCue SA. Localized infusion of IGF-I results in skeletal muscle hypertrophy in rats. *J Appl Physiol* (1985). 1998 May;84(5):1716–22.
3. Ajuwon KM, Spurlock ME. Adiponectin inhibits LPS-induced NF-kappaB activation and IL-6 production and increases PPARgamma2 expression in adipocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005 May;288(5):R1220-1225.
4. Akhmedov D, Berdeaux R. The effects of obesity on skeletal muscle regeneration. *Front Physiol*. 2013 Dec 17;4:371.
5. Bark TH, McNurlan MA, Lang CH, Garlick PJ. Increased protein synthesis after acute IGF-I or insulin infusion is localized to muscle in mice. *Am J Physiol*. 1998 Jul;275(1):E118-123.
6. Bautista CJ, Reyes-Castro LA, Lomas-Soria C, Ibáñez CA, Zambrano E. Late-in-life Exercise Ameliorates the Aging Trajectory Metabolism Programmed by Maternal Obesity in Rats: It is Never Too Late. *Archives of Medical Research* . 2024 Jun;55(4):103002.
7. Bayol SA, Simbi BH, Fowkes RC, Stickland NC. A maternal “junk food” diet in pregnancy and lactation promotes nonalcoholic Fatty liver disease in rat offspring. *Endocrinology*. 2010 Apr;151(4):1451–61.
8. Beals JW, Burd NA, Moore DR, van Vliet S. Obesity Alters the Muscle Protein Synthetic Response to Nutrition and Exercise. *Front Nutr*. 2019 Jun; 6:87.
9. Bhatnagar S, Panguluri SK, Gupta SK, Dahiya S, Lundy RF, Kumar A. Tumor necrosis factor- α regulates distinct molecular pathways and gene networks in cultured skeletal muscle cells. *PLoS One*. 2010 Oct; 5(10):e13262.
10. Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Endocrinol*. 2019;15(5):288–98.
11. Bodine SC, Baehr LM. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014 Sep;307(6):E469-484.

12. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VKM, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of Ubiquitin Ligases Required for Skeletal Muscle Atrophy. *Science*. 2001b; 294(5547):1704–8.
13. Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol*. 2001a;3(11):1014–9.
14. Boney CM, Verma A, Tucker R, Vohr BR. Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. *Pediatrics*. 2005 Mar;115(3):e290-296.
15. Borengasser SJ, Zhong Y, Kang P, Lindsey F, Ronis MJJ, Badger TM, et al. Maternal obesity enhances white adipose tissue differentiation and alters genome-scale DNA methylation in male rat offspring. *Endocrinology*. 2013 Nov;154(11):4113–25.
16. Borges G, Ottaviani JJ, van der Hooft JJJ, Schroeter H, Crozier A. Absorption, metabolism, distribution and excretion of (-)-epicatechin: A review of recent findings. *Mol Aspects Med*. 2018 Jun;61:18–30.
17. Borges G, van der Hooft JJJ, Crozier A. A comprehensive evaluation of the [2-14C](–)-epicatechin metabolome in rats. *Free Radical Biology and Medicine*. 2016 Oct;99:128–38.
18. Bouanane S, Merzouk H, Benkalfat NB, Soulimane N, Merzouk SA, Gresti J, et al. Hepatic and very low-density lipoprotein fatty acids in obese offspring of overfed dams. *Metabolism*. 2010 Dec;59(12):1701–9.
19. Braune J, Weyer U, Hobusch C, Mauer J, Brüning JC, Bechmann I, et al. IL-6 Regulates M2 Polarization and Local Proliferation of Adipose Tissue Macrophages in Obesity. *J Immunol*. 2017 Apr;198(7):2927–34.
20. Brown LA, Lee DE, Patton JF, Perry RA, Brown JL, Baum JJ, et al. Diet-induced obesity alters anabolic signalling in mice at the onset of skeletal muscle regeneration. *Acta Physiol (Oxf)*. 2015 Sep;215(1):46–57.
21. Buckley AJ, Keserü B, Briody J, Thompson M, Ozanne SE, Thompson CH. Altered body composition and metabolism in the male offspring of high fat-fed rats. *Metabolism*. 2005 Apr;54(4):500–7.
22. Campodonico-Burnett W, Hetrick B, Wesolowski SR, Schenk S, Takahashi DL, Dean TA, et al. Maternal Obesity and Western-Style Diet Impair Fetal and Juvenile Offspring Skeletal

- Muscle Insulin-Stimulated Glucose Transport in Nonhuman Primates. *Diabetes*. 2020 Jul; 69(7):1389–400.
23. Castoldi A, Naffah de Souza C, Câmara NOS, Moraes-Vieira PM. The Macrophage Switch in Obesity Development. *Front Immunol*. 2015;6:637.
 24. Catalano PM, Presley L, Minium J, Hauguel-de Mouzon S. Fetuses of obese mothers develop insulin resistance in utero. *Diabetes Care*. 2009 Jun;32(6):1076–80.
 25. Chakravarthy MV, Davis BS, Booth FW. IGF-I restores satellite cell proliferative potential in immobilized old skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985). 2000 Oct;89(4):1365–79.
 26. Chang GQ, Gaysinskaya V, Karatayev O, Leibowitz SF. Maternal high-fat diet and fetal programming: increased proliferation of hypothalamic peptide-producing neurons that increase risk for overeating and obesity. *J Neurosci*. 2008 Nov;28(46):12107–19.
 27. Chargé SBP, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev*. 2004 Jan;84(1):209–38.
 28. Cheng H, Xu N, Zhao W, Su J, Liang M, Xie Z, et al. (-)-Epicatechin regulates blood lipids and attenuates hepatic steatosis in rats fed high-fat diet. *Mol Nutr Food Res*. 2017 Nov; 61(11).
 29. Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, Kim JI, Kim JB. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016;7:30.
 30. Cohen S, Brault JJ, Gygi SP, Glass DJ, Valenzuela DM, Gartner C, et al. During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. *J Cell Biol*. 2009 Jun;185(6):1083–95.
 31. Collins KH, Hart DA, Reimer RA, Seerattan RA, Waters-Banker C, Sibole SC, et al. High-fat high-sucrose diet leads to dynamic structural and inflammatory alterations in the rat vastus lateralis muscle. *J Orthop Res*. 2016;34(12):2069–78.
 32. Collins KH, Hart DA, Smith IC, Issler AM, Reimer RA, Seerattan RA, et al. Acute and chronic changes in rat soleus muscle after high-fat high-sucrose diet. *Physiol Rep*. 2017 May;5(10):e13270.
 33. Collins KH, Herzog W, MacDonald GZ, Reimer RA, Rios JL, Smith IC, et al. Obesity, Metabolic Syndrome, and Musculoskeletal Disease: Common Inflammatory Pathways Suggest a Central Role for Loss of Muscle Integrity. *Front Physiol*. 2018 Feb; 9:112.

34. Collins KH, Paul HA, Hart DA, Reimer RA, Smith IC, Rios JL, et al. A High-Fat High-Sucrose Diet Rapidly Alters Muscle Integrity, Inflammation and Gut Microbiota in Male Rats. *Sci Rep*. 2016 Nov; 6:37278.
35. Collins KH, Reimer RA, Seerattan RA, Leonard TR, Herzog W. Using diet-induced obesity to understand a metabolic subtype of osteoarthritis in rats. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015 Jun;23(6):957–65.
36. Consitt LA, Bell JA, Houmard JA. Intramuscular lipid metabolism, insulin action, and obesity. *IUBMB Life*. 2009 Jan;61(1):47–55.
37. Damer A, El Meniawy S, McPherson R, Wells G, Harper ME, Dent R. Association of muscle fiber type with measures of obesity: A systematic review. *Obes Rev*. 2022 Jul;23(7):e13444.
38. D'Souza DM, Trajcevski KE, Al-Sajee D, Wang DC, Thomas M, Anderson JE, et al. Diet-induced obesity impairs muscle satellite cell activation and muscle repair through alterations in hepatocyte growth factor signaling. *Physiol Rep*. 2015 Aug;3(8):e12506.
39. De Fante T de, Simino LA, Reginato A, Payolla TB, Vitoréli DCG, Souza M de, et al. Diet-Induced Maternal Obesity Alters Insulin Signalling in Male Mice Offspring Rechallenged with a High-Fat Diet in Adulthood. *PLoS One*. 2016;11(8):e0160184.
40. De los Santos S, Coral-Vázquez RM, Menjivar M, Granados-Silvestre M de los Á, Tejeda ME, Reyes-Castro LA, et al. (–)-Epicatechin modifies body composition of the male offspring of obese rats. *Journal of Functional Foods*. 2019 Jul; 58:367–73.
41. De Los Santos S, Coral-Vázquez RM, Menjivar M, de Los Ángeles Granados-Silvestre M, De la Rosa S, Reyes-Castro LA, et al. (–)-Epicatechin improves body composition of male rats descendant of obese mothers postnatally fed with a high-fat diet. *Fundam Clin Pharmacol*. 2022 Jun;36(3):526–35.
42. De los Santos S, García-Pérez V, Hernández-Reséndiz S, Palma-Flores C, González-Gutiérrez CJ, Zazueta C, et al. (–)-Epicatechin induces physiological cardiac growth by activation of the PI3K/Akt pathway in mice. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2017;v61(2):1600343.
43. De los Santos S, Palma-Flores C, Zentella-Dehesa A, Canto P, Coral-Vázquez RM. (–)-Epicatechin inhibits development of dilated cardiomyopathy in δ sarcoglycan null mouse. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2018 Nov; 28(11):1188–95.

44. De Los Santos S, Reyes-Castro LA, Coral-Vázquez RM, Méndez JP, Leal-García M, Zambrano E, et al. (-)-Epicatechin reduces adiposity in male offspring of obese rats. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*. 2020 Feb;11(1):37–43.
45. Desai M, Beall M, Ross MG. Developmental Origins of Obesity: Programmed Adipogenesis. *Current diabetes reports*. 2013 Feb;13(1):27.
46. Driscoll AK, Gregory ECW. Increases in Prepregnancy Obesity: United States, 2016–2019. *NCHS Data Brief*, no 392. 2020.
47. Egawa T, Tsuda S, Goto A, Ohno Y, Yokoyama S, Goto K, et al. Potential involvement of dietary advanced glycation end products in impairment of skeletal muscle growth and muscle contractile function in mice. *Br J Nutr*. 2017 Jan;117(1):21–9.
48. Egerman MA, Glass DJ. Signaling pathways controlling skeletal muscle mass. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2014;49(1):59–68.
49. Engert JC, Berglund EB, Rosenthal N. Proliferation precedes differentiation in IGF-I-stimulated myogenesis. *J Cell Biol*. 1996 Oct;135(2):431–40.
50. Fan L, Lindsley SR, Comstock SM, Takahashi DL, Evans AE, He GW, et al. Maternal high-fat diet impacts endothelial function in nonhuman primate offspring. *Int J Obes (Lond)*. 2013 Feb;37(2):254–62.
51. Férézou-Viala J, Roy AF, Sérougne C, Gripois D, Parquet M, Bailleux V, et al. Long-term consequences of maternal high-fat feeding on hypothalamic leptin sensitivity and diet-induced obesity in the offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007 Sep;293(3):R1056-1062.
52. Fink LN, Costford SR, Lee YS, Jensen TE, Bilan PJ, Oberbach A, et al. Pro-inflammatory macrophages increase in skeletal muscle of high fat-fed mice and correlate with metabolic risk markers in humans. *Obesity (Silver Spring)*. 2014 Mar;22(3):747–57.
53. Flegal KM, Carroll MD, Kit BK, Ogden CL. Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999-2010. *JAMA*. 2012 Feb;307(5):491–7.
54. Florini JR, Ewton DZ, Coolican SA. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr Rev*. 1996 Oct;17(5):481–517.

55. Geiger J, Burkhart JM, Gambaryan S, Walter U, Sickmann A, Zahedi RP. Response: platelet transcriptome and proteome—relation rather than correlation. *Blood*. 2013 Jun; 121(26):5257–8. 11.
56. George LA, Uthlaut AB, Long NM, Zhang L, Ma Y, Smith DT, et al. Different levels of overnutrition and weight gain during pregnancy have differential effects on fetal growth and organ development. *Reprod Biol Endocrinol*. 2010 Jun; 8:75.
57. Glass DJ. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005 Oct;37(10):1974–84.
58. Glastras SJ, Chen H, Tsang M, Teh R, McGrath RT, Zaky A, et al. The renal consequences of maternal obesity in offspring are overwhelmed by postnatal high fat diet. *PLoS One*. 2017;12(2):e0172644.
59. Goodpaster BH, He J, Watkins S, Kelley DE. Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Dec;86(12):5755–61.
60. Goossens GH. The Metabolic Phenotype in Obesity: Fat Mass, Body Fat Distribution, and Adipose Tissue Function. *Obes Facts*. 2017;10(3):207–15.
61. Grayson BE, Levasseur PR, Williams SM, Smith MS, Marks DL, Grove KL. Changes in Melanocortin Expression and Inflammatory Pathways in Fetal Offspring of Nonhuman Primates Fed a High-Fat Diet. *Endocrinology*. 2010 Apr;151(4):1622–32.
62. Guo F, Jen KL. High-fat feeding during pregnancy and lactation affects offspring metabolism in rats. *Physiol Behav*. 1995 Apr;57(4):681–6.
63. Gutiérrez-Salmean G, Ciaraldi TP, Nogueira L, Barboza J, Taub PR, Hogan MC, et al. Effects of (-)-epicatechin on molecular modulators of skeletal muscle growth and differentiation. *J Nutr Biochem*. 2014 Jan;25(1):91–4.
64. Heiss C, Dejam A, Kleinbongard P, Schewe T, Sies H, Kelm M. Vascular effects of cocoa rich in flavan-3-ols. *JAMA*. 2003 Aug; 290(8):1030–1.
65. Helge JW, Fraser AM, Kriketos AD, Jenkins AB, Calvert GD, Ayre KJ, et al. Interrelationships between muscle fibre type, substrate oxidation and body fat. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1999 Sep;23(9):986–91.

66. Hirner S, Krohne C, Schuster A, Hoffmann S, Witt S, Erber R, et al. MuRF1-dependent regulation of systemic carbohydrate metabolism as revealed from transgenic mouse studies. *J Mol Biol.* 2008 Jun; 379(4):666–77.
67. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993 Jan; 259(5091):87–91.
68. Hsu MH, Sheen JM, Lin IC, Yu HR, Tiao MM, Tain YL, et al. Effects of Maternal Resveratrol on Maternal High-Fat Diet/Obesity with or without Postnatal High-Fat Diet. *Int J Mol Sci.* 2020 May;21(10):3428.
69. Jin X, Yao T, Zhou Z, Zhu J, Zhang S, Hu W, et al. Advanced Glycation End Products Enhance Macrophages Polarization into M1 Phenotype through Activating RAGE/NF- κ B Pathway. *Biomed Res Int.* 2015;2015:732450.
70. Johnson ML, Robinson MM, Nair KS. Skeletal muscle aging and the mitochondrion. *Trends Endocrinol Metab.* 2013 May;24(5):247–56.
71. Kamei Y, Miura S, Suzuki M, Kai Y, Mizukami J, Taniguchi T, et al. Skeletal muscle FOXO1 (FKHR) transgenic mice have less skeletal muscle mass, down-regulated Type I (slow twitch/red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control. *J Biol Chem.* 2004 Sep; 279(39):41114–23.
72. Karalaki M, Fili S, Philippou A, Koutsilieris M. Muscle Regeneration: Cellular and Molecular Events. *In Vivo.* 2009 Sep;23(5):779–96.
73. Khan IM, Perrard XYD, Brunner G, Lui H, Sparks LM, Smith SR, et al. Intermuscular and perimuscular fat expansion in obesity correlates with skeletal muscle T cell and macrophage infiltration and insulin resistance. *International Journal of Obesity.* 2015 Nov; 39(11):1607–18.
74. King JC. Maternal Obesity, Metabolism, and Pregnancy Outcomes. *Annual Review of Nutrition.* 2006;26(1):271–91.
75. Kozakowska M, Pietraszek-Gremplewicz K, Jozkowicz A, Dulak J. The role of oxidative stress in skeletal muscle injury and regeneration: focus on antioxidant enzymes. *J Muscle Res Cell Motil.* 2015 Dec;36(6):377–93.
76. Kusminski CM, Shetty S, Orci L, Unger RH, Scherer PE. Diabetes and apoptosis: lipotoxicity. *Apoptosis.* 2009 Dec;14(12):1484–95.

77. Lagirand-Cantaloube J, Offner N, Csibi A, Leibovitch MP, Batonnet-Pichon S, Tintignac LA, et al. The initiation factor eIF3-f is a major target for atroglin1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy. *EMBO J*. 2008 Apr; 27(8):1266–76.
78. 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 Feb;63(2):250–62.
79. Latouche C, Heywood SE, Henry SL, Ziemann M, Lazarus R, El-Osta A, et al. Maternal overnutrition programs changes in the expression of skeletal muscle genes that are associated with insulin resistance and defects of oxidative phosphorylation in adult male rat offspring. *J Nutr*. 2014 Mar;144(3):237–44.
80. Lee DC, Shook RP, Drenowatz C, Blair SN. Physical activity and sarcopenic obesity: definition, assessment, prevalence and mechanism. *Future Sci OA*. 2016 Sep;2(3):FSO127.
81. Lee SJ, Leem YE, Go GY, Choi Y, Song YJ, Kim I, et al. Epicatechin elicits MyoD-dependent myoblast differentiation and myogenic conversion of fibroblasts. *PLoS One*. 2017;12(4):e0175271.
82. Leuner B, Max M, Thamm K, Kausler C, Yakobus Y, Bierhaus A, et al. RAGE influences obesity in mice. Effects of the presence of RAGE on weight gain, AGE accumulation, and insulin levels in mice on a high fat diet. *Z Gerontol Geriatr*. 2012 Feb;45(2):102–8.
83. Levin BE, Govek E. Gestational obesity accentuates obesity in obesity-prone progeny. *Am J Physiol*. 1998 Oct;275(4):R1374-1379.
84. Li SW, Yu HR, Sheen JM, Tiao MM, Tain YL, Lin IC, et al. A maternal high-fat diet during pregnancy and lactation, in addition to a postnatal high-fat diet, leads to metabolic syndrome with spatial learning and memory deficits: beneficial effects of resveratrol. *Oncotarget*. 2017 Dec; 8(67):111998–2013.
85. Lightfoot AP, Sakellariou GK, Nye GA, McArdle F, Jackson MJ, Griffiths RD, et al. SS-31 attenuates TNF- α induced cytokine release from C2C12 myotubes. *Redox Biol*. 2015 Dec;6:253–9.
86. Long NM, Rule DC, Zhu MJ, Nathanielsz PW, Ford SP. Maternal obesity upregulates fatty acid and glucose transporters and increases expression of enzymes mediating fatty acid biosynthesis in fetal adipose tissue depots. *J Anim Sci*. 2012 Jul;90(7):2201–10.

87. Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*. 1998 Aug 27;394(6696):897–901.
88. Maier T, Güell M, Serrano L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett*. 2009 Dec; 583(24):3966–73.
89. McCurdy CE, Bishop JM, Williams SM, Grayson BE, Smith MS, Friedman JE, et al. Maternal high-fat diet triggers lipotoxicity in the fetal livers of nonhuman primates. *J Clin Invest*. 2009 Feb;119(2):323–35.
90. Meydani M, Hasan ST. Dietary polyphenols and obesity. *Nutrients*. 2010 Jul;2(7):737–51.
91. Morrison M, Heijden R van der, Heeringa P, Kaijzel E, Verschuren L, Blomhoff R, et al. Epicatechin attenuates atherosclerosis and exerts anti-inflammatory effects on diet-induced human-CRP and NFκB in vivo. *Atherosclerosis*. 2014 Mar; 233(1):149–56.
92. Mukund K y Subramaniam S. Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2020 Jan;12(1):e1462.
93. Neri C, Edlow AG. Effects of Maternal Obesity on Fetal Programming: Molecular Approaches. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(2):a026591.
94. Nisr RB, Shah DS, Ganley IG, Hundal HS. Proinflammatory NFκB signalling promotes mitochondrial dysfunction in skeletal muscle in response to cellular fuel overloading. *Cell Mol Life Sci*. 2019 Dec; 76(24):4887–904.
95. Ohanna M, Sobering AK, Lapointe T, Lorenzo L, Praud C, Petroulakis E, et al. Atrophy of S6K1(-/-) skeletal muscle cells reveals distinct mTOR effectors for cell cycle and size control. *Nat Cell Biol*. 2005 Mar;7(3):286–94.
96. Ottaviani JJ, Borges G, Momma TY, Spencer JPE, Keen CL, Crozier A, et al. The metabolome of [2-(14)C](-)-epicatechin in humans: implications for the assessment of efficacy, safety, and mechanisms of action of polyphenolic bioactives. *Sci Rep*. 2016 Jul; 6:29034.
97. Parente LB, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Deleterious effects of high-fat diet on perinatal and postweaning periods in adult rat offspring. *Clinical Nutrition*. 2008 Aug; 27(4):623–34.

98. Pattanakuhar S, Pongchaidecha A, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. The effect of exercise on skeletal muscle fibre type distribution in obesity: From cellular levels to clinical application. *Obes Res Clin Pract.* 2017;11(5 Suppl 1):112–32.
99. Pavlath GK, Dominov JA, Kegley KM, Miller JB. Regeneration of transgenic skeletal muscles with altered timing of expression of the basic helix-loop-helix muscle regulatory factor MRF4. *Am J Pathol.* 2003 May;162(5):1685–91.
100. Pelosi L, Giacinti C, Nardis C, Borsellino G, Rizzuto E, Nicoletti C, et al. Local expression of IGF-1 accelerates muscle regeneration by rapidly modulating inflammatory cytokines and chemokines. *FASEB J.* 2007 May;21(7):1393–402.
101. Perdiguero E, Sousa-Victor P, Ballestar E, Muñoz-Cánoves P. Epigenetic regulation of myogenesis. *Epigenetics.* 2009 Nov;4(8):541–50.
102. Philippou A, Halapas A, Maridaki M, Koutsilieris M. Type I insulin-like growth factor receptor signaling in skeletal muscle regeneration and hypertrophy. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2007;7(3):208–18.
103. Powers SK, Ji LL, Kavazis AN, Jackson MJ. Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle. *Compr Physiol.* 2011 Apr;1(2):941–69.
104. Prajapati P, Kumar A, Singh J, Saraf SA, Kushwaha S. Azilsartan Ameliorates Skeletal Muscle Wasting in High Fat Diet (HFD)-induced Sarcopenic Obesity in Rats via Activating Akt Signalling Pathway. *Archives of Gerontology and Geriatrics.* 2023 Sep 1; 112:105025.
105. Qasim A, Turcotte M, de Souza RJ, Samaan MC, Champredon D, Dushoff J, et al. On the origin of obesity: identifying the biological, environmental and cultural drivers of genetic risk among human populations. *Obes Rev.* 2018 Feb;19(2):121–49.
106. Ramirez-Sanchez I, De Los Santos S, Gonzalez-Basurto S, Canto P, Mendoza-Lorenzo P, Palma-Flores C, et al. (-)-Epicatechin improves mitochondrial-related protein levels and ameliorates oxidative stress in dystrophic δ -sarcoglycan null mouse striated muscle. *FEBS Journal.* 2014 Dec; 281(24):5567–80.
107. Ramsay JE, Ferrell WR, Crawford L, Wallace AM, Greer IA, Sattar N. Maternal obesity is associated with dysregulation of metabolic, vascular, and inflammatory pathways. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Sep;87(9):4231–7.

108. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey JrGC. 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.* 1993;123(11):1939-1951.
109. Reggiani C y Te Kronnie T. RyR isoforms and fibre type-specific expression of proteins controlling intracellular calcium concentration in skeletal muscles. *J Muscle Res Cell Motil.* 2006;27(5-7):327-35.
110. Rodríguez-González GL, Reyes-Castro LA, Bautista CJ, Beltrán AA, Ibáñez CA, Vega CC, et al. Maternal obesity accelerates rat offspring metabolic ageing in a sex-dependent manner. *J Physiol.* 2019 Dec;597(23):5549-63.
111. Rodríguez-González GL, Vargas-Hernández L, Reyes-Castro LA, Ibáñez CA, Bautista CJ, Lomas-Soria C, et al. Resveratrol Supplementation in Obese Pregnant Rats Improves Maternal Metabolism and Prevents Increased Placental Oxidative Stress. *Antioxidants (Basel).* 2022 Sep 21;11(10):1871.
112. Ross MG, Desai M. Developmental Programming of Offspring Obesity, Adipogenesis, and Appetite. *Clin Obstet Gynecol.* 2013 Sep;56(3):529-36.
113. Rubinstein NA, Kelly A. The diversity of muscle fiber types and its origin during development. *Myology.* 2004 Jan 1;87-103.
114. Salto R, Girón MD, Manzano M, Martín MJ, Vílchez JD, Bueno-Vargas P, et al. Programming Skeletal Muscle Metabolic Flexibility in Offspring of Male Rats in Response to Maternal Consumption of Slow Digesting Carbohydrates during Pregnancy. *Nutrients.* 2020 Feb; 12(2):528.
115. Samuelsson AM, Matthews PA, Argenton M, Christie MR, McConnell JM, Jansen EHJM, 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 Feb;51(2):383-92.
116. Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell.* 2004 Apr;117(3):399-412.
117. Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J.* 2013 Sep;280(17):4294-314.

118. Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev.* 2011 Oct;91(4):1447–531.
119. Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, et al. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature.* 2011; 473: 337-342.
120. Serra D, Mera P, Malandrino MI, Mir JF, Herrero L. Mitochondrial fatty acid oxidation in obesity. *Antioxid Redox Signal.* 2013 Jul;19(3):269–84.
121. Sewell MF, Huston-Presley L, Super DM, Catalano P. Increased neonatal fat mass, not lean body mass, is associated with maternal obesity. *Am J Obstet Gynecol.* 2006 Oct;195(4):1100–3.
122. Shamah-Levy T, Romero-Martínez M, Barrientos-Gutiérrez T, Cuevas-Nasu L, Bautista-Arredondo S, Colchero MA, et al. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2021 sobre Covid-19. Resultados nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública; 2022. Disponible en: <https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanutcontinua2021/informes.php>
123. Shay J, Elbaz HA, Lee I, Zielske SP, Malek MH, Hüttemann M. Molecular Mechanisms and Therapeutic Effects of (-)-Epicatechin and Other Polyphenols in Cancer, Inflammation, Diabetes, and Neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:181260.
124. Shortreed KE, Krause MP, Huang JH, Dhanani D, Moradi J, Ceddia RB, et al. Muscle-specific adaptations, impaired oxidative capacity and maintenance of contractile function characterize diet-induced obese mouse skeletal muscle. *PLoS One.* 2009 Oct 6;4(10):e7293.
125. Sishi B, Loos B, Ellis B, Smith W, du Toit EF, Engelbrecht AM. Diet-induced obesity alters signalling pathways and induces atrophy and apoptosis in skeletal muscle in a prediabetic rat model. *Exp Physiol.* 2011 Feb;96(2):179–93.
126. Stewart FM, Freeman DJ, Ramsay JE, Greer IA, Caslake M, Ferrell WR. Longitudinal assessment of maternal endothelial function and markers of inflammation and placental function throughout pregnancy in lean and obese mothers. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Mar;92(3):969–75.

127. Sullivan EL, Smith MS, Grove KL. Perinatal exposure to high-fat diet programs energy balance, metabolism and behavior in adulthood. *Neuroendocrinology*. 2011;93(1):1–8.
128. Tain YL, Lin YJ, Sheen JM, Lin IC, Yu HR, Huang LT, et al. Resveratrol prevents the combined maternal plus postweaning high-fat-diets-induced hypertension in male offspring. *J Nutr Biochem*. 2017a Oct;48:120–7.
129. Tain YL, Lin YJ, Sheen JM, Yu HR, Tiao MM, Chen CC, et al. High Fat Diets Sex-Specifically Affect the Renal Transcriptome and Program Obesity, Kidney Injury, and Hypertension in the Offspring. *Nutrients*. 2017 Apr; 9(4):357.
130. Tidball JG, Villalta SA. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010 May;298(5):R1173-1187.
131. Tintignac LA, Lagirand J, Batonnet S, Sirri V, Leibovitch MP, Leibovitch SA. Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. *J Biol Chem*. 2005 Jan; 280(4):2847–56.
132. Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, Joaquin M, Sticker M, et al. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature*. 2004 Sep; 431(7005):200–5.
133. Vazquez-Prieto MA, Bettaieb A, Haj FG, Fraga CG, Oteiza PI. (–)-Epicatechin prevents TNF α -induced activation of signaling cascades involved in inflammation and insulin sensitivity in 3T3-L1 adipocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2012 Nov; 527(2):113–8.
134. Walker CD, Naef L, d’Asti E, Long H, Xu Z, Moreau A, et al. Perinatal maternal fat intake affects metabolism and hippocampal function in the offspring: a potential role for leptin. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Nov;1144:189–202.
135. Wearing SC, Hennig EM, Byrne NM, Steele JR, Hills AP. Musculoskeletal disorders associated with obesity: a biomechanical perspective. *Obes Rev*. 2006 Aug;7(3):239–50.
136. Weiss R, Bremer AA, Lustig RH. What is metabolic syndrome, and why are children getting it? *Ann N Y Acad Sci*. 2013 Apr;1281(1):123–40.

137. Witt SH, Granzier H, Witt CC, Labeit S. MURF-1 and MURF-2 target a specific subset of myofibrillar proteins redundantly: towards understanding MURF-dependent muscle ubiquitination. *J Mol Biol.* 2005 Jul; 350(4):713–22.
138. Wu H, Ballantyne CM. Skeletal muscle inflammation and insulin resistance in obesity. *J Clin Invest.* 2017 Jan;127(1):43–54.
139. Yan X, Zhu MJ, Dodson MV, Du M. Developmental Programming of Fetal Skeletal Muscle and Adipose Tissue Development. *Journal of Genomics.* 2013 Nov; 1:29–38.
140. Yang Y, Jemiolo B, Trappe S. Proteolytic mRNA expression in response to acute resistance exercise in human single skeletal muscle fibers. *J Appl Physiol* (1985). 2006 Nov;101(5):1442–50.
141. Yu Z, Han S, Zhu J, Sun X, Ji C, Guo X. 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(4):e61627.
142. Zambrano E, Ibáñez C, Martínez-Samayoa PM, Lomas-Soria C, Durand-Carbajal M, Rodríguez-González GL. Maternal Obesity: Lifelong Metabolic Outcomes for Offspring from Poor Developmental Trajectories During the Perinatal Period. *Arch Med Res.* 2016 Jan;47(1):1–12.
143. Zambrano E, Martínez-Samayoa PM, Rodríguez-González GL, Nathanielsz PW. Dietary intervention prior to pregnancy reverses metabolic programming in male offspring of obese rats. *J Physiol.* 2010 May;588(Pt 10):1791–9.
144. Zammit PS, Golding JP, Nagata Y, Hudon V, Partridge TA, Beauchamp JR. Muscle satellite cells adopt divergent fates : a mechanism for self-renewal? *Journal of Cell Biology.* 2004 Jul;166(3):347–57.
145. Zhang FM, Wu HF, Wang KF, Yu DY, Zhang XZ, Ren Q, et al. Transcriptome profiling of fast/glycolytic and slow/oxidative muscle fibers in aging and obesity. *Cell Death Dis.* 2024 Jun 28;15(6):459.