



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**Efecto de los ácidos grasos omega-3 en el desarrollo y
función de las placentas en ratas Wistar**

**TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGA**

**P R E S E N T A
AIME JAQUELINE MENDOZA MIRANDA**

Director de tesis:

Dr. Ricardo Mejía Zepeda

Co-directora de tesis:

Dra. María del Consuelo Figueroa García



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2021



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.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio 4 de la Unidad de Biomedicina de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM bajo la tutoría del Doctor Ricardo Mejía Zepeda y cotutoría de la Doctora María del Consuelo Figueroa García.

Al Programa de Apoyo de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT IN 213421 otorgado al Dr. Ricardo Mejía Zepeda. UBIMED. FESI-UNAM.

A los miembros del sínodo por todo su apoyo y tiempo en el proyecto de investigación.

Dra. María del Consuelo Figueroa García

M. en C. Pilar Amellali Badillo Suárez

Dra. Norma Laura Delgado Buenrostro

Dra. Martha Martínez García

DEDICATORIAS

A **mis padres Mercedes y Héctor**, quienes con su esfuerzo me han permitido llegar a cumplir mi sueño de ser Bióloga, gracias por acompañarme en este largo camino. Espero algún día poder retribuir un poco de todo lo que han hecho por mí.

A mi **hermana** por ser un ejemplo para mí. Gracias por tratar de ser mi guía.

A **Edgar** por estar conmigo en esta última etapa brindándome su amor, paciencia y apoyo. Gracias por motivarme y por creer en mí.

A **Héctor** por compartir tantos momentos conmigo. No puedo imaginar cómo hubiesen sido estos últimos 6 años sin tu compañía. Gracias por brindarme tu apoyo incondicional y por las tantas aventuras que hemos vivido. Te quiero montones. We are team, team.

A **Shaday** por ser mi compañera y amiga a pesar de ser tan diferentes. Gracias por ser un ejemplo de perseverancia y dedicación.

A la **doctora Figueroa** por ayudarme en todo este proceso y por ser parte fundamental de este trabajo. Gracias por ayudarme cuando no sabía qué hacer y por compartir una parte de este proyecto conmigo.

Al **doctor Ricardo** por aceptarme y darme la oportunidad de poder culminar con esta etapa tan importante en el laboratorio. Gracias por todo el apoyo que me brinda.

A **Lucía** por ser una persona importante en mi vida. Espero algún día poder ser un ejemplo para ti.

A **mis compañeros del laboratorio** por brindarme su apoyo y ayuda.

El futuro es aquello en lo que lo convertimos.

Janne Teller

ÍNDICE

I. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	I
II. ABREVIATURAS	III
III. RESUMEN	V
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 La Placenta.....	1
1.1.1 Clasificación de la placenta hemocorial	3
1.1.2 Transporte de nutrientes a través de la placenta.....	5
1.2 Impacto de los ácidos grasos en la salud durante la gestación	5
1.2.1 Transporte y metabolismo de los ácidos grasos a través la placenta.....	6
2 ANTECEDENTES	8
3 JUSTIFICACIÓN	9
4 HIPÓTESIS	10
5 OBJETIVOS	11
5.1 Objetivo general	11
5.2 Objetivos particulares.....	11
6 MATERIAL Y MÉTODOS	12
6.1 Animales de experimentación.....	12
6.2 Lineamientos de bioética	12
6.3 Diseño del experimento.....	12
6.4 Determinación de los Parámetros fisiológicos de la madre	13
6.5 Obtención de las muestras (hígado materno y placenta)	13
6.6 Parámetros morfométricos de las placentas y los fetos	13
6.7 Aislamiento de mitocondrias de placenta e hígado.....	14
6.7.1 Oximetría	15

6.8	Análisis estadístico	15
7	RESULTADOS	16
7.1	Parámetros fisiológicos de la madre.....	16
7.2	Curva de tolerancia a la glucosa (CTG)	17
7.3	Parámetros morfométricos del feto e índice de masa corporal	19
7.4	Parámetros morfométricos de la placenta.....	21
7.5	Eficiencia Placentaria	24
7.6	Velocidad de consumo de oxígeno en mitocondrias de hígado materno y placenta.....	25
8	DISCUSIÓN	28
8.1	Parámetros fisiológicos de la madre.....	28
8.2	Parámetros morfométricos del feto.....	31
8.2.1	Peso fetal.....	31
8.2.2	Talla fetal(distancia céfalo-caudal)	32
8.3	Parámetros morfométricos de la placenta.....	34
8.3.1	Peso.....	34
8.3.2	Talla (diámetro y grosor).....	35
8.4	Índice de eficiencia Placentaria (IEP) e Índice de masa corporal del feto (IMC)	35
8.5	Reabsorciones y molas.....	37
8.6	Consumo de oxígeno mitocondrial de células de placenta	38
9	CONCLUSIONES	41
10	FUENTES DE INFORMACIÓN	42

I. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Modelo de detección de nutrientes placentarios	2
Figura 2. Clasificación de la placenta hemocorial: número de capas del trofoblasto.....	4
Figura 3. Representación del mecanismo de transporte de ácidos grasos en la placenta y posibles destinos metabólicos.....	7
Figura 4. Plantilla sanguínea de Fetos (a) y placentas (b).....	14
Figura 5. Peso corporal (a) y concentración de glucosa en sangre (b) de ratas Wistar suplementadas con ácidos grasos omega-3 durante la gestación.....	16
Figura 6. Curvas de tolerancia a la glucosa de ratas Wistar suplementadas con ácidos grasos omega-3 durante la gestación.....	18
Figura 7. Parámetros morfométricos defetos (a; peso y b; talla) e índice de masa corporal (c)de ratas Wistar suplementadas con ácidos grasos omega-3 durante la gestación....	20
Figura 8. Parámetros morfométricos de la placenta (a; peso, b; grosor y c; diámetro) de ratas Wistar suplementadas con ácidos grasos omega-3 durante la gestación.	22
Figura 9. Fetos y placentas de ratas Wistar suplementadas con ácidos grasos omega-3 durante la gestación.	23

Figura 10. Índice de eficiencia placentaria de ratas Wistar suplementadas con ácidos grasos omega-3 durante la gestación.....	24
Figura 11. Consumo de oxígeno [Estado 3 (a), Estado 4 (b) y Control Respiratorio (c)] en mitocondrias de hígado materno, ratas Wistar suplementadas con ácidos grasos omega-3 durante la gestación.	26
Figura 12. Consumo de oxígeno [Edo 3 (a), Edo 4 (b) y CR (c)] en mitocondrias de placenta, ratas Wistar suplementadas con ácidos grasos omega-3 durante la gestación.....	27
Tabla 1. Clasificación histológica de la placenta.....	3

II. ABREVIATURAS

ALA	Ácido α -linolénico
AMPK	Proteína quinasa activada por monofosfato de adenosina
CN	Grupo control
CTG	Curva de tolerancia a la glucosa
CR	Control respiratorio
DG	Días de gestación
DHA	Ácido docosahexaenoico
EL	Lipasa epitelial
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FAT	Translocasa de ácidos grasos
FABP	Proteínas de unión a ácidos grasos
FATP	Proteína transportadora de ácidos grasos
GSK-3	Glucógeno sintasa-3
IEP	Índice de eficiencia placentaria
IMC	Índice de masa corporal
LPL	Lipoproteína lipasa
LT	Leucotrienos
ω-3	Ácidos grasos omega-3
ω-3-CC	Ácidos grasos omega-3de cadena corta
ω-3-CL	Ácidos grasos omega-3de cadena larga
PF	Percentil fetal
PG	Prostaglandinas

pLPL	Lipoproteína lipasa placentaria
RCIU	Restricción del crecimiento intrauterino
TX	Tromboxanos

III. RESUMEN

En las últimas décadas se han implementado alternativas en la prevención y/o tratamiento de algunos problemas que se presentan durante el embarazo, uno de ellos es el uso de los ácidos grasos omega-3 como suplementos alimenticios, debido a que se ha observado que incrementan el peso al nacimiento, hay un mayor desarrollo del cerebro fetal y un menor riesgo de parálisis cerebral y de depresión puerperal, evita la muerte intrauterina, reduce el riesgo de: parto prematuro, eclampsia y malformaciones. Sin embargo, existe evidencia de que el consumo excesivo de estos suplementos puede derivar en alteraciones como son gestación prolongada y productos con sobrepeso condiciones que ponen en riesgo la salud materno-fetal y pueden provocar el desarrollo de enfermedades metabólicas a largo plazo. Todo lo anterior sin evidencia científica que lo avale. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de la administración de ácidos grasos omega-3 de cadena corta (ω -3-CC) [ácido alfa linolénico (ALA)] y larga (ω -3-CL) [ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido eicosapentaenoico (EPA)] durante la gestación en la función y desarrollo de la placenta en ratas Wistar. Para la realización de trabajo se utilizaron 72 ratas-hembras de la cepa Wistar con un peso aproximado de 250 g. Los animales se dividieron en 3 grupos de 24 hembras, las cuales fueron apareadas con machos sanos de la misma estirpe. Los animales positivos a gestación, detectados mediante frotis vaginal, fueron suplementados con ALA (ω 3-CC) o EPA-DHA (ω 3-CL) con 125 mg/kg de peso corporal a partir del día 1 de gestación. A su vez, los grupos se dividieron en cuatro grupos de acuerdo a los días de gestación (15, 17, 19 y 21) con 6 animales cada uno. Las hembras se sacrificaron de acuerdo al periodo de gestación y se obtuvieron las medidas morfométricas de la placenta [peso, grosor, diámetro e índice de eficiencia placentaria (EP)] y de los fetos [peso, talla e índice de masa corporal (IMC)]. Se presentaron cambios en la concentración de glucosa sanguínea y el peso de las ratas gestantes de los grupos suplementados. Los datos muestran que en los parámetros morfométricos del feto no existe evidencia que demuestre que la suplementación con ácidos grasos omega-3 de cadena larga mejore el crecimiento fetal en ratas Wistar. Por el contrario en el grupo suplementado con ω 3-CC existe un incremento en el peso y la talla de los fetos. Con respecto a las placentas, se tiene que en el peso los grupos ω -3-CC y ω -3-CL obtuvieron valores menores en comparación al grupo CN siendo más

evidente a los 21 DG. En cuanto a la talla (grosor y diámetro) de la placenta el grupo suplementado con ALA (ω -3-CC) tuvo valores más altos que el grupo CN y, a pesar de que el peso fue menor, estos parámetros se correlacionaron de manera positiva. En el índice de eficiencia placentaria los grupos suplementados con ALA y EPA-DHA tienen un índice menor a los 15 y 17 días y tienden a incrementar exponencialmente hacia el final de la gestación (21 días). Con respecto, al índice de masa corporal los grupos suplementados tuvieron un efecto positivo en los grupos suplementados respecto al CN. La suplementación de ácidos grasos omega-3 de cadena corta y larga generó cambios en el consumo de oxígeno de las mitocondrias de hígado materno, sin embargo esto no afectó al CR. Por otra parte, en las mitocondrias de la placenta el consumo de oxígeno en los grupos ω -3-CC y ω -3-CL tiende a un comportamiento similar al CN y de igual manera ocurre con el control respiratorio. En conclusión, la suplementación de ácidos grasos poliinsaturados, durante la gestación, tienen un efecto en el crecimiento de la placenta y, por ende, en el feto.

1 INTRODUCCIÓN

La gestación es una etapa fisiológica que se caracteriza por cambios metabólicos, los cuales dependen de determinantes genéticos, del tamaño fetal, estado nutricional y del estilo de vida materno; estos cambios pueden ser detectados morfológica y bioquímicamente. Durante esta etapa se pueden presentar patologías que ponen en riesgo tanto a la madre como al producto, por ejemplo, la diabetes mellitus tipo 2, hipertensión, preeclampsia, gestación prolongada, infección en vías urinarias, entre otras (Herring y Oken, 2010). En algunos estudios epidemiológicos realizados en México se ha reportado que el porcentaje de incidencia para ciertos padecimientos durante el embarazo como la preeclampsia/eclampsia, la cual se presenta entre el 2% y 10%; la infección en vías urinarias, en particular la asintomática, que se observa entre el 17% y 20%, también se ha calculado que la prevalencia de diabetes gestacional se ubica entre 8.4% y 17.7% (Bringas y Baleón, 2014). Algunos de los problemas que se generan durante el embarazo están asociados a problemas de la placenta como: la restricción del crecimiento intrauterino (RCIU), muerte intrauterina y riesgo de parto prematuro (Percy *et al.*, 1991). Debido a lo anterior, en los últimos años se han implementado estrategias terapéuticas asociadas al uso de ácidos grasos omega-3 (ω -3) para la prevención o tratamiento de los problemas antes mencionados, sin embargo se desconoce el impacto que puede llegar a causar en embarazos normo evolutivos (Bauer *et al.*, 1998, Barrera y Fernández, 2015).

1.1 La Placenta

La placenta es un órgano transitorio, dinámico y metabólicamente activo, encargado de cubrir la demanda de nutrientes del feto a través de la regulación metabólica y fisiológica de la madre (Díaz *et al.*, 2014). En la siguiente figura, se muestra un modelo en el cual se explica como la placenta integra las señales maternas y fetales para el suministro de nutrientes.

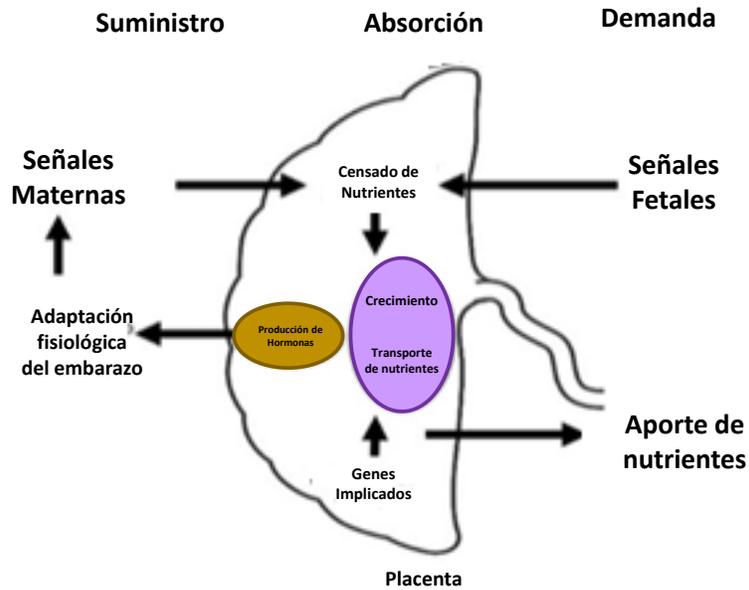


Figura 1. Modelo de detección de nutrientes placentarios. Modificado de: Díaz *et al.* 2014.

La placenta está compuesta por una parte fetal (corion) y una parte materna (decidua basal) (Tsatsaris *et al.*, 2006; Barrera y Fernández, 2015). Existen diferentes tipos de placentas, las cuales se clasifican de acuerdo a: a) las capas de la barrera interhemal, b) invasividad del trofoblasto y reacción celular decidual, c) formación del sincitiotrofoblasto, d) interrelaciones del flujo sanguíneo materno-fetal, e) el tipo de interdigitación, f) la estructura histológica y g) eliminación del tejido placentario al nacimiento (Leiser y Kaufmann, 1994). La clasificación más utilizada es la de la estructura histológica; la cual utiliza como referencia la cantidad de capas que forman la barrera placentaria (Fukurawa *et al.*, 2014).

Tabla 1. Clasificación histológica de la placenta.

Epiteliocorial	Tiene paquetes de células de trofoblasto cumular, no existe destrucción o invasión de los tejidos maternos (Enders y Carter, 2006).
Endoteliocorial	El corion se encuentra en contacto con el endotelio de los vasos sanguíneos del endometrio (Roa <i>et al.</i> , 2012).
Hemocorial	El epitelio coriónico del trofoblasto invade y destruye al epitelio de la mucosa uterina y al endotelio capilar uterino, por lo tanto, las microvellosidades vascularizadas del epitelio coriónico son irrigadas directamente por la sangre materna (Soares <i>et al.</i> , 2018).

1.1.1 Clasificación de la placenta hemocorial

Los mamíferos euterios (placentarios) como los primates, los lagomorfos y los roedores se caracterizan por presentar una placenta de tipo hemocorial (Tamayo *et al.*, 2014). En general este tipo de placentas presentan membrana basal, citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto, pero no presentan la misma arquitectura histológica ya que cada una de ellas tiene un número distinto de capas del trofoblasto: hemomonocorial; una capa (primates), hemodicorial; dos capas (conejos) y hemotricorial; tres capas (roedores) (Fukurawa *et al.*, 2014) (Ver figura 1).

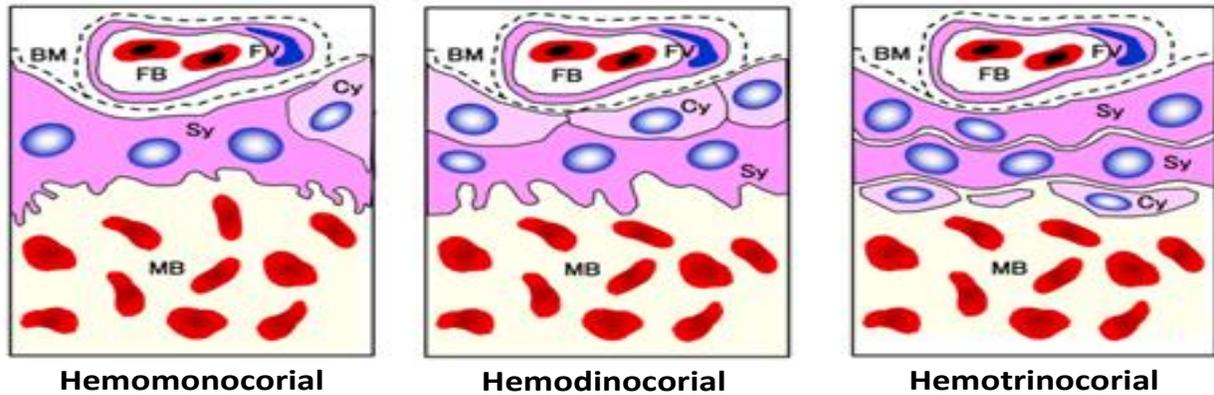


Figura 2. Clasificación de la placenta hemocorial: número de capas del trofoblasto.

Modificado de Fukurawa *et al.*, 2014.

BM, membrana basal; *Cy*, citotrofoblasto; *FB*, sangre fetal; *FV*, vaso fetal; *MB*, sangre materna; *Sy*, sincitiotrofoblasto.

En la placenta hemomonocorial el trofoblasto está formado por una sola capa de sincitiotrofoblasto, la cual está en contacto con la sangre materna a través de las microvellosidades que se proyectan en el espacio sanguíneo materno, debajo de esta capa se encuentran dispersos los citotrofoblastos, los cuales no están en contacto directo con la sangre materna. Se sugiere que estas células pueden ser precursoras del sincitiotrofoblasto (Takata *et al.*, 1997).

La placenta hemodinicorial está formada por la zona laberíntica, la zona basal, la decidua y el mesometrio. Existen dos capas de trofoblasto, una externa y una interna, las cuales separan la sangre materna de la fetal, la capa externa es la que está en contacto directo con la sangre materna y está compuesta por el sincitiotrofoblasto que a su vez se une a la capa de citotrofoblasto (Fukurawa *et al.*, 2014).

En el presente trabajo se estudia la placenta de la rata la cual es de tipo hemotricorial. La placenta hemotricorial está formada por la zona laberíntica, la zona basal, la decidua y las glándulas auriculares. En la zona laberíntica hay tres capas de trofoblastos que separan los vasos sanguíneos maternos de los fetales; la parte que entra en contacto directo con la sangre materna, se conoce como citotrofoblasto con una superficie microvellosa seguido de dos capas de sincitiotrofoblasto; la zona basal está formada por

tres tipos de células diferenciadas: (1) espongiotrofoblastos, (2) células gigantes trofoblásticas y (3) células de glucógeno y la decidua que se compone de las células deciduales mesometriales (Fukurawa *et al.*, 2014).

1.1.2 Transporte de nutrientes a través de la placenta

El transporte de nutrientes a través de la placenta se puede llevar a cabo de diferentes maneras, entre las que se encuentran la difusión simple (se realiza a través del flujo sanguíneo), difusión facilitada (se produce por una red de gradiente de concentración) y transporte activo (implica proteínas transportadoras en la superficie celular y se requiere energía adicional) (Bauer *et al.*, 1998).

La placenta tiene un alto requerimiento de energía para llevar a cabo sus funciones, en donde las mitocondrias juegan un papel muy importante, ya que, una de sus funciones es la generación de ATP por fosforilación oxidativa utilizando sustratos derivados de la oxidación β y el ciclo del ácido tricarboxílico, además está involucrada en la señalización celular y la síntesis de hormonas esteroideas (Sferruzzi-Perri *et al.*, 2019).

1.2 Impacto de los ácidos grasos en la salud durante la gestación

De acuerdo con la teoría de Baker las alteraciones del metabolismo materno durante la gestación existe un proceso de adaptación por el que la nutrición y otros factores alteran el desarrollo fetal teniendo como consecuencia cambios en el metabolismo después del nacimiento relacionados con las enfermedades y síndromes metabólicos de la infancia y del adulto (Barrera y Fernández, 2015).

Los ω -3 son ácidos grasos esenciales (AGEs) debido a que los mamíferos carecen de las enzimas necesarias para biosintetizarlos (Valenzuela *et al.*, 2011). Los ω -3 son de gran importancia, ya que, aportan energía, forman parte de las membranas celulares siendo responsables de muchas de sus propiedades fisicoquímicas y actúan como segundos mensajeros (Sanhueza *et al.*, 2015). Además de lo ya mencionado se les

atribuyen propiedades benéficas y se usan de forma cotidiana como suplementos alimenticios o nutracéuticos en el tratamiento de enfermedades de tipo metabólico y durante la gestación para favorecer el crecimiento y desarrollo de la placenta y el feto, así como la prevención de complicaciones o patologías durante esta etapa (Valenzuela *et al*, 2011).

Los principales ω -3 son el ácido graso de cadena corta C 18:3 o ácido α -linolénico (ALA) y los ácidos grasos de cadena larga C 22:6 o ácido docosahexaenoico (DHA) y el C 20:5 o el ácido eicosapentaenoico (EPA) (National Institutes of Health, 2018). Algunas de las fuentes de obtención de ALA son las plantas, el zooplancton y el fitoplancton. Algunos peces azules como el salmón son fuentes ricas en DHA y EPA (Sinclair *et al.*, 2002). Se plantea que el ALA es una fuente de energía para las funciones celulares en el oocito y la pre-implantación del embrión, así como en el desarrollo de este y es precursor en la síntesis de ácidos grasos de mayor tamaño (el DHA y el EPA); los cuales cumplen importantes funciones en el organismo (Morales *et al.*, 2012). Mientras que el DHA es un importante componente de los fosfolípidos, participa en las funciones de transporte celular, incrementa la afinidad de receptores, modifica la fluidez y la permeabilidad de las membranas, la actividad enzimática y la comunicación celular; además de lo anterior se ha observado que es un componente importante de la retina y el cerebro (Leyva-Rendón, 2011). Por su parte, el EPA es precursor de eicosanoides; sustancias similares a las hormonas, como: las prostaglandinas (PG), los tromboxanos (TX) y los leucotrienos (LT), los cuales son agentes antiinflamatorios y participan en la regulación metabólica y fisiología del desarrollo (Wen y Chen, 2010).

1.2.1 Transporte y metabolismo de los ácidos grasos a través la placenta

Para que los nutrientes que se encuentran en el plasma materno lleguen al feto deben atravesar el sincitiotrofoblasto, difundirse a través del estroma veloso placentario y pasar a través del endotelio capilar fetal. En el caso particular de los ácidos grasos las proteínas encargadas del transporte de estas moléculas a través del sincitiotrofoblasto son la lipoproteína lipasa placentaria (LPL) y la lipasa epitelial (EL) presentes en la decidua

basal. Es importante señalar que los ácidos grasos no esterificados liberados por la LPL y el EL son transportados al citoplasma del sincitiotrofoblasto por proteínas de membrana [proteína transportadora de ácidos grasos (FATP), translocasa de ácidos grasos (FAT) y proteínas de unión a ácidos grasos de la membrana plasmática o membrana plasmática placentaria] donde interactúan con proteínas de unión a ácidos grasos (FABP) y son esterificados o utilizados en la β -oxidación. Los ácidos grasos no utilizados por el sincitiotrofoblasto son transportados hacia el feto vía hemática a través de la FATP y la FAT(Figura 3). (Jones *et al.*, 2014)

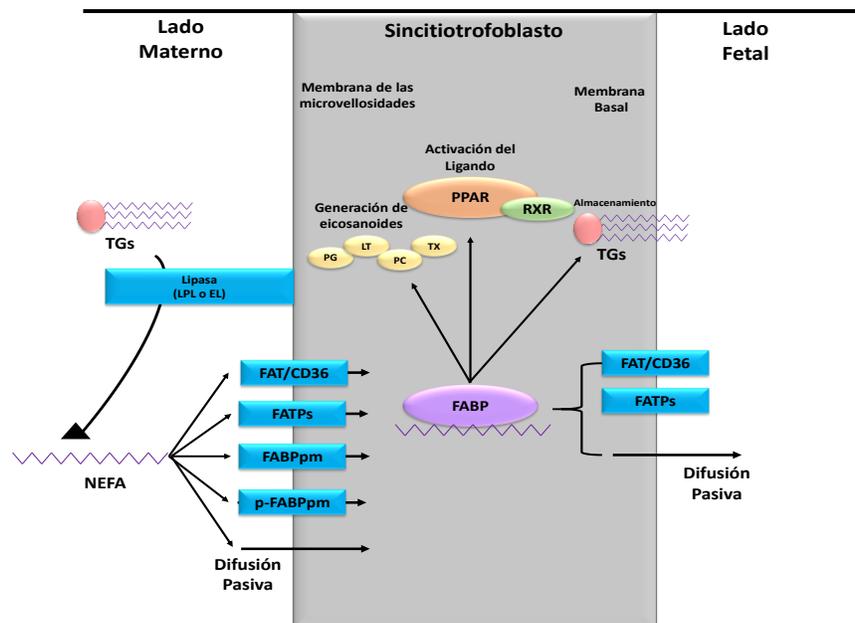


Figura 3. Representación del mecanismo de transporte de ácidos grasos en la placenta y posibles destinos metabólicos. Modificado de Jones *et al.*, 2014.

TGs, triglicéridos; LPL, lipoproteína lipasa; EL, lipasa epitelial; NEFA, ácidos grasos no esterificados; FAT/CD36, translocasa de ácidos grasos; FATPs, proteínas transportadoras de ácidos grasos; FABP, proteínas unidas a ácidos grasos; FABPpm, proteínas de unión a ácidos grasos de la membrana plasmática; p-FABPpm, proteínas de unión a ácidos grasos de la membrana plasmática placentaria; PG, prostaglandinas; LT, leucotrienos; PC, prostaciclina; TX, tromboxanos; PPAR, receptor activado por proliferador de peroxisomas; RXR, Receptor de ácido retinoico X.

2 ANTECEDENTES

La suplementación de ácidos grasos omega-3 de cadena corta (ω -3-CC) y larga (ω -3-CL) es recomendada durante la gestación, ya que se plantea que puede tener ciertos beneficios tanto en la madre como en la placenta y los fetos e incluso en la vida adulta de estos últimos. En 1993, Yonekubo *et al.*, realizaron un estudio para determinar los efectos de la suplementación de aceite de pescado (rico en DHA), en ratas Wistar gestantes, encontrando cambios significativos en el aumento de peso corporal, el tamaño de la camada y el peso corporal de los fetos, así como cambios en la composición de ácidos grasos de la leche materna y en el cerebro e hígado en los fetos y neonatos. Sin embargo, estudios similares realizados por Joshi *et al.* (2003), no se observaron cambios en el peso corporal de los neonatos a los 7, 14 y 21 días de gestación entre el grupo tratado y el control. Además de lo anterior Jones *et al.* (2014) señalan que la ingesta excesiva de DHA durante la gestación puede tener efectos perjudiciales tanto para la madre como para el producto. En investigaciones realizadas con ratas gestantes (Church *et al.*, 2010) se observó que la ingesta excesiva de ω -3 es tóxica para las crías, lo cual se ve reflejado en los procesos sensoriales y/o neurológicos durante la edad adulta. En 2015, Figueroa-García *et al.*, observaron una disminución en la actividad de las mitocondrias placentarias de ratas Wistar inducidas a diabetes tipo 2, lo que sugiere que este órgano es susceptible a los cambios fisiológico de la madre derivados de la diabetes. Por su parte Thornburg *et al.*, (2016), reportan que la programación fetal está asociada a cambios morfológicos (peso y talla) y funcionales (metabolismo y la eficiencia placentaria) de la placenta, en animales suplementados con ácidos grasos omega 3, y plantea que dichos cambios pueden conducir al desarrollo de enfermedades crónicas en los adultos como: diabetes mellitus tipo 2, enfermedad cardiovascular e hipertensión.

3 JUSTIFICACIÓN

En los últimos años el uso de los ácidos grasos ω -3 como suplementos alimenticios, nutracéuticos o medicina alternativa, entre otros, ha incrementado debido al fácil acceso y gran difusión que se les da. Estos productos se recomiendan en el tratamiento y prevención de diferentes padecimientos de tipo metabólico como: la diabetes mellitus, el síndrome metabólico, la hipertensión y el riesgo de enfermedad cardiovascular, también se utilizan como paliativos en el desarrollo del cáncer. Además de lo anterior los ω -3 son recomendados durante el embarazo, atribuyéndoles propiedades benéficas, como promotores del crecimiento fetal y en la prevención de patologías de la placenta; todo ello respaldado por estudios clínicos, los cuales carecen de evidencia científica, cuantitativa y crítica, sin tomar en cuenta la evidencia que se tiene de que el consumo excesivo de estos ω -3 pone en riesgo la salud materno-fetal debido a que puede prolongar la gestación y aumentar el peso de los productos a término con efectos en la salud a largo plazo como: desarrollo de enfermedades metabólicas del adulto. Sin embargo, y pese a que existen trabajos relacionados con el consumo de ácidos grasos ω -3 durante la gestación, no se tienen evidencias claras de las implicaciones que puedan llegar a generarse a nivel morfológico y/o fisiológico en la placenta, debido a que la mayoría de los estudios que se han realizado no muestran resultados concluyentes por lo que carecen de evidencia científica.

4 HIPÓTESIS

La suplementación de ácidos grasos omega-3 de cadena corta (ALA) y larga (DHA y EPA) a ratas Wistar durante la gestación modifica el metabolismo de la madre y la placenta, lo que se ve reflejado en una pobre ganancia de peso e intolerancia a la glucosa en las madres y cambios morfométricos de los fetos, además de cambios morfológicos de la placenta y de la función de las mitocondrias del hígado (materno) y la placenta.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Analizar el efecto de la administración de ácidos grasos omega-3 de cadena corta (ácido alfa linolénico; ALA) y larga (ácido docosahexaenoico; DHA y ácido eicosapentaenoico; EPA) durante la gestación en el desarrollo y función de la placenta en ratas Wistar.

5.2 Objetivos particulares

- Analizar el peso y la concentración de glucosa en sangre de ratas Wistar gestantes suplementadas con ácidos grasos omega-3 de cadena corta (ω -3-CC) y larga (ω -3-CL) a los 15, 17, 19 y 21 días de gestación.
- Determinar si la suplementación de ácidos grasos omega-3 de cadena corta (ω -3-CC) y larga (ω -3-CL) durante la gestación (15, 17, 19 y 21 días) en ratas Wistar modifica los parámetros morfométricos de la placenta y el feto.
- Analizar la función de las mitocondrias de placenta e hígado materno a los 15, 17, 19 y 21 días de gestación de ratas Wistar suplementadas con ácidos grasos omega-3 de cadena corta (ω -3-CC) y larga (ω -3-CL)

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Animales de experimentación

Se utilizaron 72 hembras de ratas Wistar de 3 meses de edad, con un peso promedio de 250 g, albergadas en el bioterio de la FES Iztacala. Los animales se albergaron en grupos de 3 individuos como lo marca la Norma (NOM 062-ZOO-1999), en jaulas de polisulfonato, con una temperatura de 22 °C y un fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Se proporcionó agua y alimento (Labdiet 5012 Pet-Food©) *ad libitum*.

Se realizó frotis vaginal para diagnóstico del estro, las hembras que resultaron positivas fueron puestas con machos sanos toda una noche, por la mañana se realizó frotis vaginal para diagnóstico de apareo. Para los propósitos de edad de gestación se toma como día 0.5 la fecha de confirmación de apareo. A los 12 días post coito se realizó diagnóstico de gestación por palpación abdominal (gravidéz de los cuernos uterinos).

6.2 Lineamientos de bioética

El estudio se realizó de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM 062-ZOO-1999).

6.3 Diseño del experimento

Se formaron 3 grupos experimentales de 24 animales cada uno, de acuerdo al siguiente esquema: Grupo control (CN) sin tratamiento, Grupos suplementado ALA, 125 mg/kg/día de aceite de linaza (ω -3-CC) y Grupo suplementado DHA y EPA, 125 mg/kg/día de aceite de salmón (ω -3-CL), a su vez cada grupo experimental se dividió, de acuerdo a la edad gestación, en cuatro subgrupos (15, 17, 19y 21 días de gestación). Los tratamientos se administraron a partir del día 0.5 y hasta completar la edad gestacional requerida.

6.4 Determinación de los Parámetros fisiológicos de la madre

Peso: Se midió a partir del día 0.5 y hasta completar la edad de gestación requerida con una balanza digital de la marca Komdox.

Curva de tolerancia a la glucosa (CTG): Se determinó la concentración basal de glucosa en sangre, seguida de la administración de 2 g de dextrosa/kg de peso en 1 mL de agua inyectable vía oral y finalmente se cuantificó la concentración de glucosa en sangre cada 30 minutos durante 2 horas, con tiras reactivas en un equipo Accu-Chek®active. Para esta prueba las ratas se mantuvieron en un ayuno de 4 horas y se realizó los días 0.5, 15, 17, 19 y 21 de la gestación. Se tomó como unidad experimental a la rata gestante.

6.5 Obtención de las muestras (hígado materno y placenta)

Los animales se indujeron a anestesia con pentobarbital sódico (40 mg/kg de peso) vía intraperitoneal. Posteriormente, se realizó una incisión profunda en línea media abdominal. Se realizó exsanguinación vía cardiaca para el drenado de órganos y sacrificio de los animales. Se reservó el hígado y los cuernos uterinos grávidos para su procesamiento. El útero se cortó de forma longitudinal para exponer y disecar los *conceptus*.

6.6 Parámetros morfométricos de las placentas y los fetos

Los fetos y sus placentas se colocaron sobre hojas blancas con la finalidad de obtener una huella sanguínea para su posterior análisis. Las impresiones de los fetos y sus placentas se usaron para calcular la longitud céfalo-caudal (distancia que existe del mesencéfalo hasta el punto de curvatura caudal del embrión en posición natural) como indicador de la talla en los fetos (figura 4a) y en el caso de las placentas el contorno; el cual se dibujó con una plantilla y se midió con el vernier digital (figura 4b). El peso de

cada feto y su respectiva placenta se midió con una balanza de la marca Camry® y el grosor de las placentas con un vernier electrónico digital de la marca Truper®.

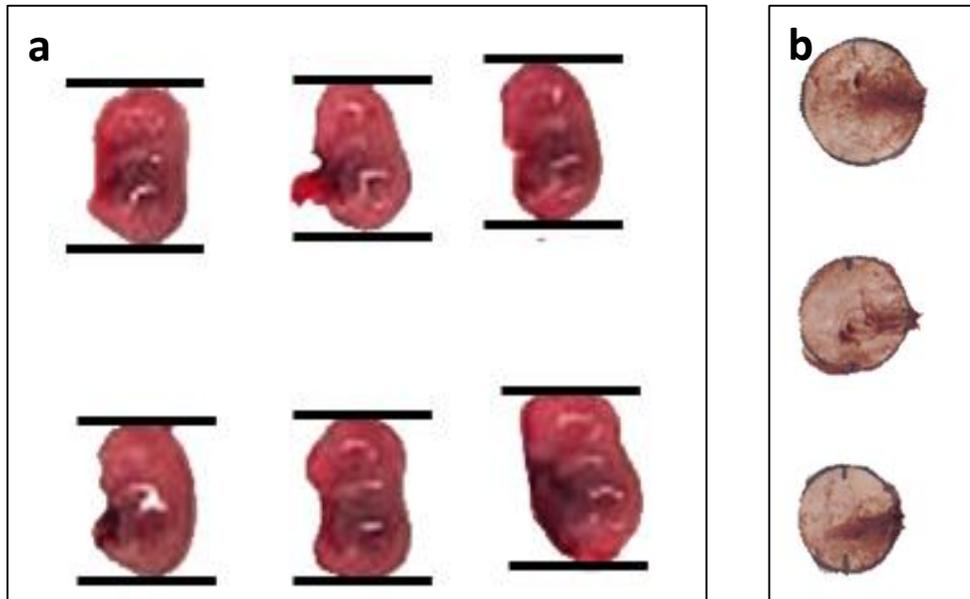


Figura 4. Plantilla sanguínea de Fetos (a) y placentas (b).

6.7 Aislamiento de mitocondrias de placenta e hígado

Se homogenizó por separado el tejido de la placenta y el hígado (cortados en pedazos pequeños) en un homogeneizador Potter-Elvehjem de vidrio con medio H, el cual contiene 0.07 M de sacarosa 0.21 M de manitol, 20 mM de HEPES, albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos al 0.1%, con un pH final de 7.4. Para la obtención de las mitocondrias del homogenado se realizaron centrifugaciones diferenciales, en una centrífuga Sorvall ST 16R, ThermoScientific con rotor F15-6x100) con una temperatura de 4°C a 2500 rpm por 10 minutos (una vez para placentas y dos para hígado), se recolectó el sobrenadante y se centrifugó a 7500 rpm por 10 minutos, se conservó la pastilla para incubarla por 40 minutos en 5 mL de medio H con albúmina al 0.5%, pasado el tiempo se llevaron a un volumen de 30 mL con medio H y se centrifugó a 9000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, se recolectó la pastilla en microtubos tipo Eppendorf de 1.5 mL y se determinó la concentración de proteína mediante el método de Bradford (1976).

6.7.1 Oximetría

La velocidad de consumo de oxígeno se determinó utilizando un electrodo de Clark, adosado a una cámara de incubación de 1.5 mL, cerrada con una tapa de vidrio esmerilada, en un baño termostatzado de circulación y con agitación constante. Se midió la actividad basal (estado 4) de las mitocondrias (500 µg de proteína) en presencia del medio de respiración (elaborado con 250mM de sacarosa, 10 mM de succinato, 10 mM de MgCl₂, 0.1% de EGTA, BSA al 0.1% y H₃PO₄ al 1.6 mM con un pH de 7.4) y se adicionaron 2 µL de ADP [100 mM] para medir el estado activo en fosforilación (estado 3).

El consumo de oxígeno se registró en un polarógrafo conectado al electrodo tipo Clark. La respiración mitocondrial se evaluó en los estados 3 (alto contenido de ADP y sustrato) y 4 (bajo contenido de ADP y alto de sustrato) para calcular el control respiratorio (velocidad en estado 3/velocidad en estado 4).

6.8 Análisis estadístico

Se calcularon las medidas de tendencia central promedio (μ) y desviación estándar (σ). Se realizó análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con prueba de Tukey con un intervalo de confianza de 0.95 ($p < 0.05$) en el programa SigmaPlot 12.

7 RESULTADOS

7.1 Parámetros fisiológicos de la madre

El aumento del peso corporal de las ratas gestantes (figura 5) tiende a ser lineal, a excepción del grupo suplementado con EPA-DHA, ya que es 14.02 % menor ($p < 0.05$) a los 19 días de gestación con respecto al grupo control. En la figura 5b se muestran las concentraciones de glucosa en sangre al minuto 0 en los grupos suplementados con ALA y EPA-DHA, se puede observar que presentan un comportamiento similar al grupo control con concentraciones de 88 a 90 mg/dL.

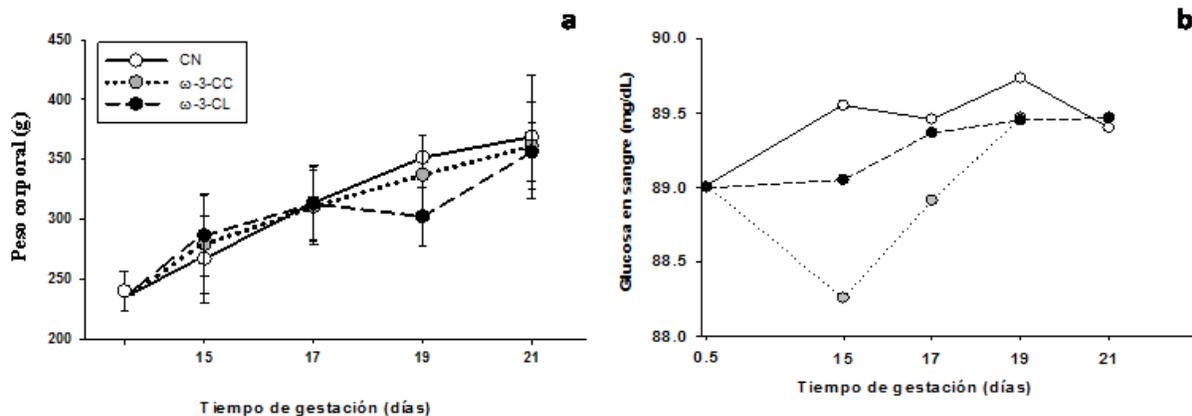


Figura 5. Peso corporal (a) y concentración de glucosa en sangre (b) de ratas Wistar suplementadas con ácidos grasos omega-3 durante la gestación.

Ratas control (CN), ratas con suplemento ALA (ω -3-CC) y ratas con suplemento de DHA y EPA (ω -3-CL).
 $n = 6$.

7.2 Curva de tolerancia a la glucosa (CTG)

En la figura 6 se presentan las curvas de tolerancia a la glucosa de las diferentes edades gestacionales en las que fue medido este parámetro. En cuanto a los 0.5 días de gestación se observa que la concentración de glucosa en sangre a los 0 minutos es de 89.3 mg/dL llegando al pico máximo a los 30 minutos con un aumento del 26.6% y conforme aumenta el tiempo la concentración regresa a la concentración basal de 85 mg/dL.

A los 15 y 17 días de gestación se muestra que el grupo suplementado con ALA (ω -3-CC) a pesar de tener concentraciones menores que el grupo CN sigue el mismo comportamiento, mientras que el grupo suplementado con EPA-DHA, a los 15 días, no presenta el pico máximo de glucosa a los 30 minutos teniendo un 26.6% menos que el grupo control, manteniéndose constante hasta los 90 minutos y, posteriormente se presenta una disminución a los 120 minutos y a los 17 días de gestación presenta una tendencia parecida al del grupo control. Por otro lado, la tendencia del grupo control y el grupo ω -3-CC es similar al del día 0, contrario al grupo ω -3-CL que tiende a mantenerse en concentraciones constantes.

En los 19 días de gestación los grupos suplementados tienden a seguir un comportamiento similar al CN, sin embargo el pico máximo en el grupo ω -3-CC es 13.54% mayor que el control mientras que en el grupo ω -3-CL aparentemente la concentración máxima de glucosa en sangre se presenta hasta los 60 minutos.

Por otra parte, a los 21 días de gestación el grupo suplementado con ALA presenta concentraciones más bajas que el grupo control, por el contrario el grupo ω -3-CL tiene un comportamiento similar al CN a excepción de la concentración a los 60 minutos en donde es 16.4% mayor.

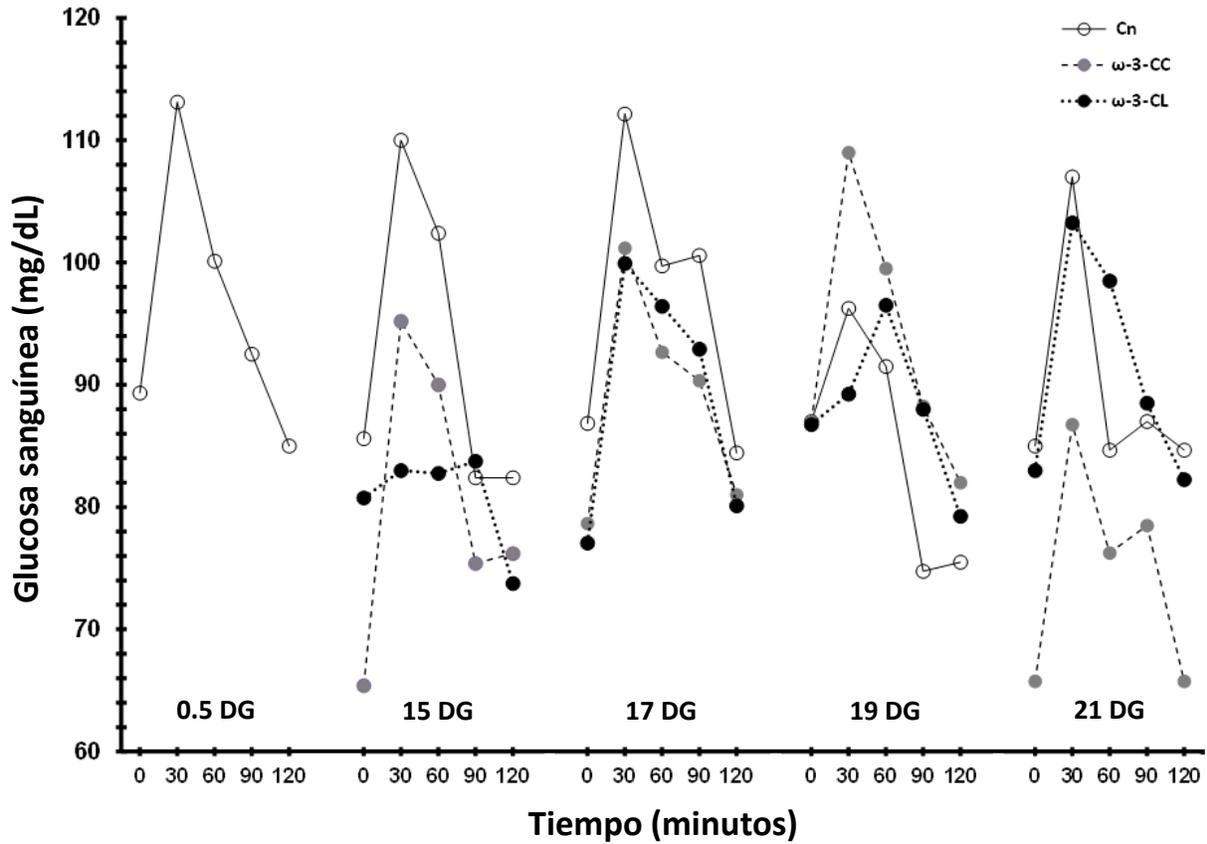


Figura 6. Curvas de tolerancia a la glucosa de ratas Wistar suplementadas con ácidos grasos omega-3 durante la gestación.

Ratas control (CN), ratas con suplemento ALA (ω -3-CC) y ratas con suplemento de DHA y EPA (ω -3-CL), DG (días de gestación). n = 6.

7.3 Parámetros morfométricos del feto e índice de masa corporal

Los parámetros morfométricos del feto (peso y talla) en función del tiempo de gestación, se muestran en la 7a y 7b, respectivamente. El peso fetal muestra una tendencia exponencial en todos los grupos experimentales. Sin embargo: en el grupo ω -3-CC se presenta un aumento en los días 17 y 21 de la gestación con una diferencia de 26.83 % y 14.2 % en relación al grupo control.

En la talla fetal se observa una tendencia similar en todos los grupos experimentales, no obstante, a los 15 días el grupo ω -3-CC presenta una disminución del 10.17 % con respecto del grupo control. En cuanto al grupo ω -3-CL se observa un aumento de 7.05% a los 19 días de gestación y una disminución de 3.91% a los 21 días respecto al grupo control.

En cuanto al índice de masa corporal (IMC) a los 15 días de gestación en los grupos suplementados con ALA y EPA-DHA son 14 % y 17.40 % menos que el CN mientras que a los 21 días tienen un aumento significativo ($p < 0.05$) de 7.47 % y 6.4 % en comparación con el grupo que no fue suplementado.

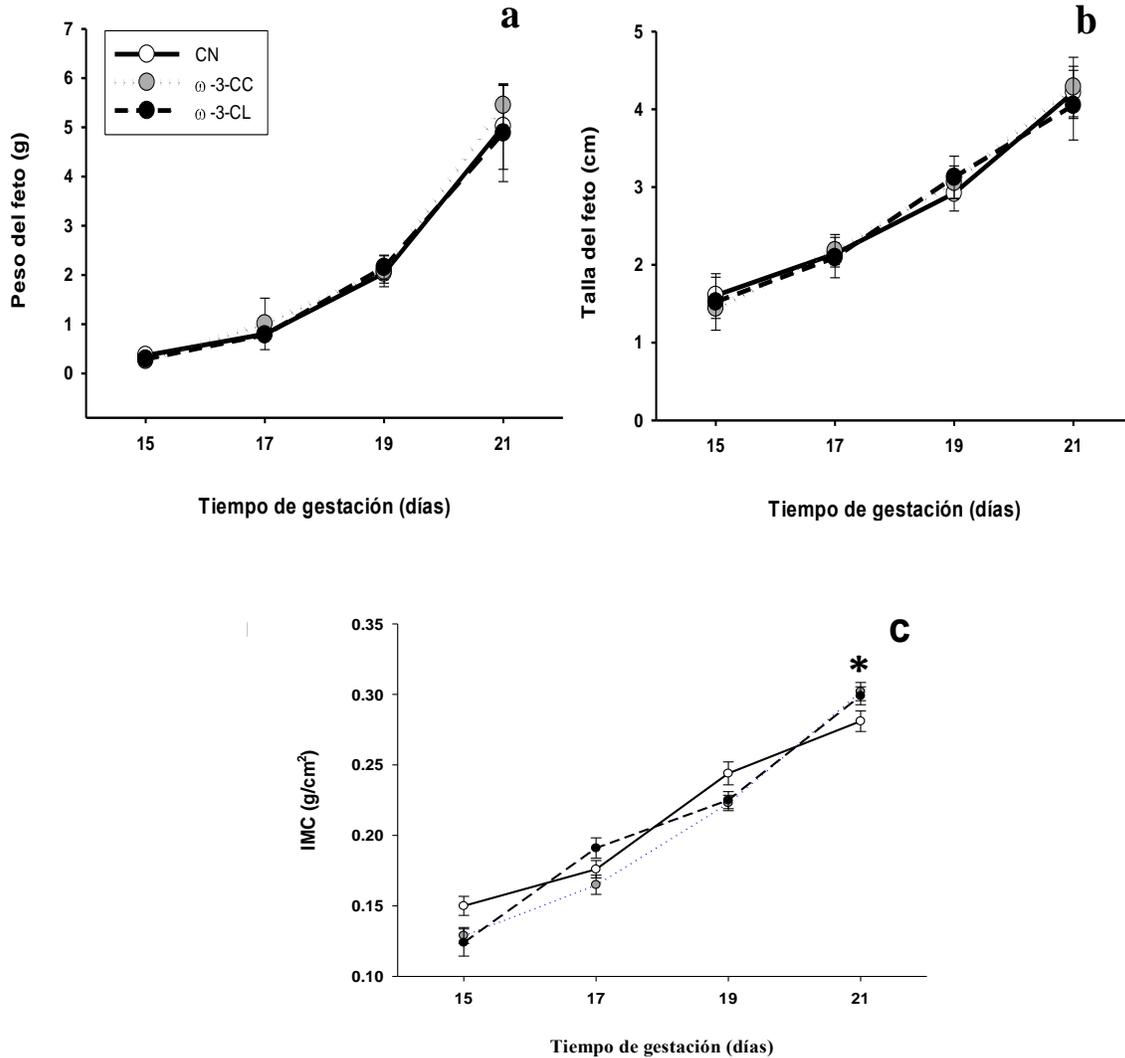


Figura 7. Parámetros morfométricos de fetos (a; peso y b; talla) e índice de masa corporal (c) de ratas Wistar suplementadas con ácidos grasos omega-3 durante la gestación.

Ratas control (CN), ratas con suplemento ALA (ω -3-CC) y ratas con suplemento de DHA y EPA (ω -3-CL).
 n = 6. *p < 0.05

7.4 Parámetros morfométricos de la placenta

En la figura 8a se observa que la placenta de los grupos suplementados con ALA y DHA-EPA tienen una menor ganancia de peso (16.76% y 26.03% respectivamente) comparados con el grupo control a los 21 días de edad. Respecto al grosor de la placenta (figura 8b) se puede observar que en todos los tratamientos existe un comportamiento similar al grupo control, sin embargo este parámetro a los 15 días son 19.81% (ω -3-CC) y 12.3% (ω -3-CL) menores que el grupo control mientras que a los 17 días en el grupo ω -3-CC (22.06%) y 19 días en el grupo ω -3-CL (19.4%) tienden a ser mayores que el grupo CN. El diámetro de la placenta (figura 8c) es menor a los 15 (12.67 %; ω -3-CC y 7.02; ω -3CL) y 21 días (7.05 %; ω -3-CC y 4.57 % ω -3-CL) respecto al control. Así mismo se puede observar que el menor diámetro placentario pertenece al grupo ω -3-CC.

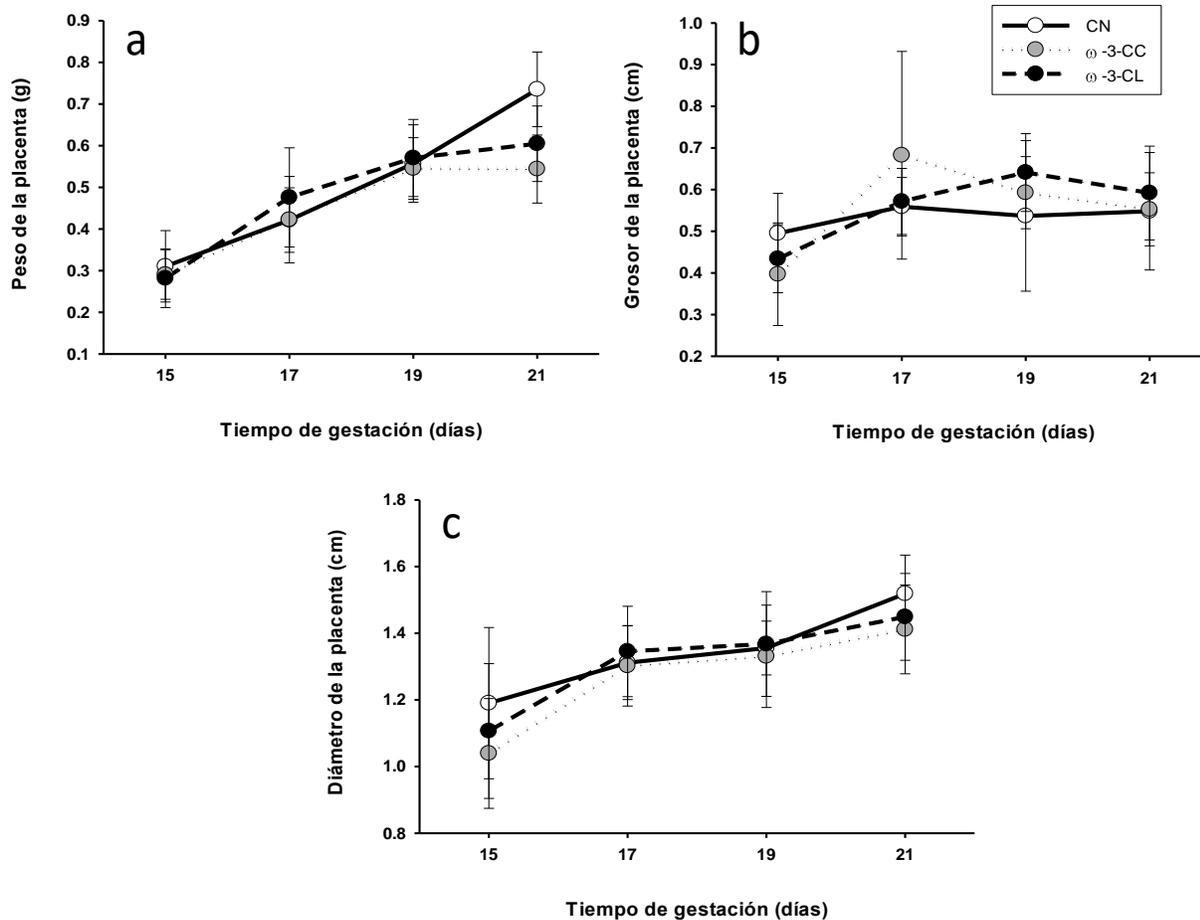
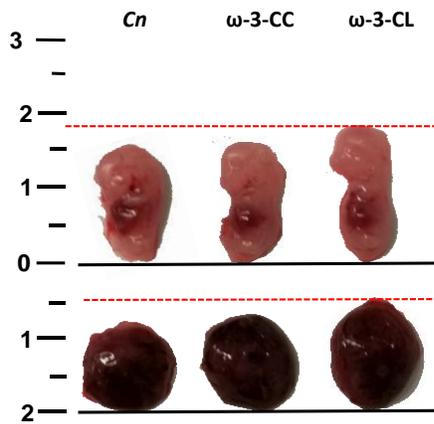


Figura 8. Parámetros morfométricos de la placenta (a; peso, b; grosor y c; diámetro) de ratas Wistar suplementadas con ácidos grasos omega-3 durante la gestación.

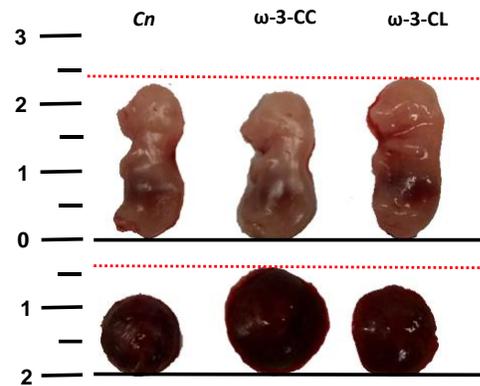
Ratas control (CN), ratas con suplemento ALA (ω -3-CC) y ratas con suplemento de DHA y EPA (ω -3-CL). n = 6.

En la figura 9 se muestran los fetos con sus respectivas placentas en donde se puede observar el aumento en los parámetros morfométricos conforme al tiempo de gestación, así como las diferencias en las medidas entre los grupos suplementados con ácidos grasos omega-3 de cadena corta o larga y el grupo control.

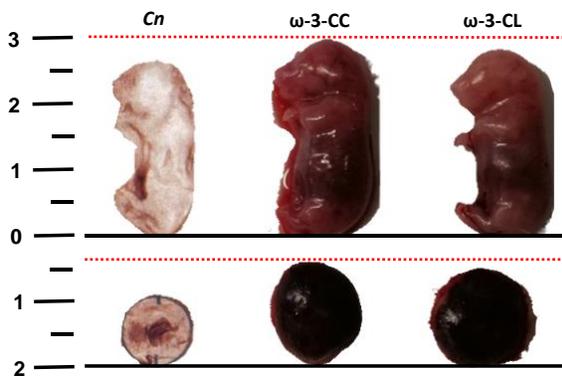
15 DG



17 DG



19 DG



21 DG

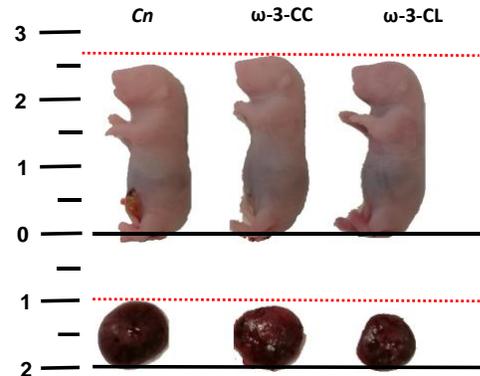


Figura 9. Fetos y placentas de ratas Wistar suplementadas con ácidos grasos omega-3 durante la gestación.

Ratas control (CN), ratas con suplemento ALA (ω -3-CC) y ratas con suplemento de DHA y EPA (ω -3-CL), DG (días de gestación). DG: días de gestación.

7.5 Eficiencia Placentaria

En la figura 10, se presenta la eficiencia placentaria (EP), es decir, la relación entre el peso fetal y el peso de la placenta, en función del tiempo de gestación, se puede observar que en los grupos s (ω -3-CC) y 20.5% (ω -3-CL)] a los 21 días de gestación en comparación con el grupo control.

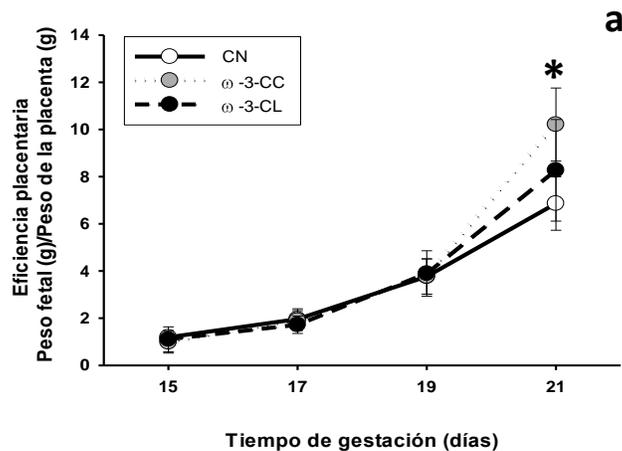


Figura 10. Índice de eficiencia placentaria de ratas Wistar suplementadas con ácidos grasos omega-3 durante la gestación.

Ratas control (CN), ratas con suplemento ALA (ω -3-CC) y ratas con suplemento de DHA y EPA (ω -3-CL).
n = 6. *p < 0.05.

7.6 Velocidad de consumo de oxígeno en mitocondrias de hígado materno y placenta

En la figura 11a se observa que en el hígado materno el consumo de oxígeno mitocondrial del estado cuatro, existen diferencias ($p < 0.05$) a los 19 días de gestación, tanto en el grupo suplementado con ω -3-CC como en el de ω -3-CL, con un 65.01% y 94.5 % mayor que el grupo control, respectivamente; este mismo comportamiento se presenta en el estado 3 (figura 11b) con un 81.47% y 87.53%. En cuanto al CR (figura 10c) se presenta una tendencia a disminuir con respecto al tiempo de gestación; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los grupos suplementados.

Por otro lado, el consumo de oxígeno de mitocondrias de placenta (figura 12) no se encontró diferencia estadística; sin embargo, existe diferencia matemática de los distintos parámetros que se determinaron. El consumo de oxígeno del Edo 3 (Figura 12a) en el grupo ω -3-CC a los 17 de gestación es 21.14% mayor que el CN, mientras que en el grupo suplementado con ω -3-CL la diferencia matemática tiende a ser mayor a los 15 (19.7%) y 21 (21.57%) días de gestación en relación al grupo CN. En la figura 12b se pueden observar que el comportamiento del Edo 4 de la respiración mitocondrial es muy parecido al del Estado 3. Por otra parte, el análisis del control respiratorio (CR) (Figura 12c) es menor en los grupos suplementados con ω -3-CC (21.8%) y ω -3-CL (16.36%), respecto al control, a los 15 DG; a los 17 días este parámetro es mayor en el grupo ω -3-CL (17.75%) y al día 21 de la gestación el grupo de los ω -3-CC tiene un aumento del 21.7% con respecto a su grupo control.

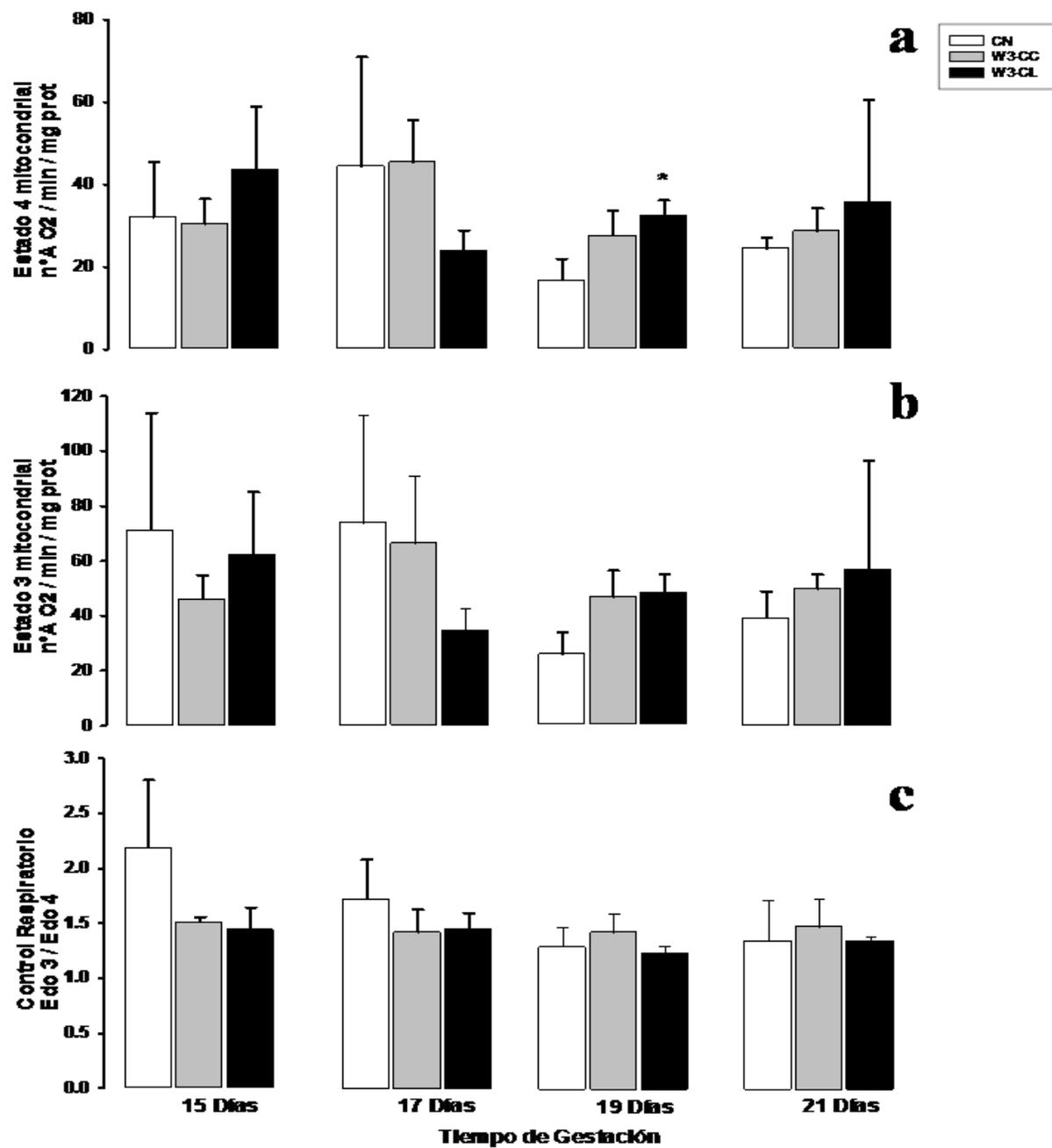


Figura 11. Consumo de oxígeno [Estado 3 (a), Estado 4 (b) y Control Respiratorio (c)] en mitocondrias de hígado materno, ratas Wistar suplementadas con ácidos grasos omega-3 durante la gestación.

Ratas control (CN), ratas con suplemento ALA (ω -3-CC) y ratas con suplemento de DHA y EPA (ω -3-CL). n = 6. *p < 0.05.

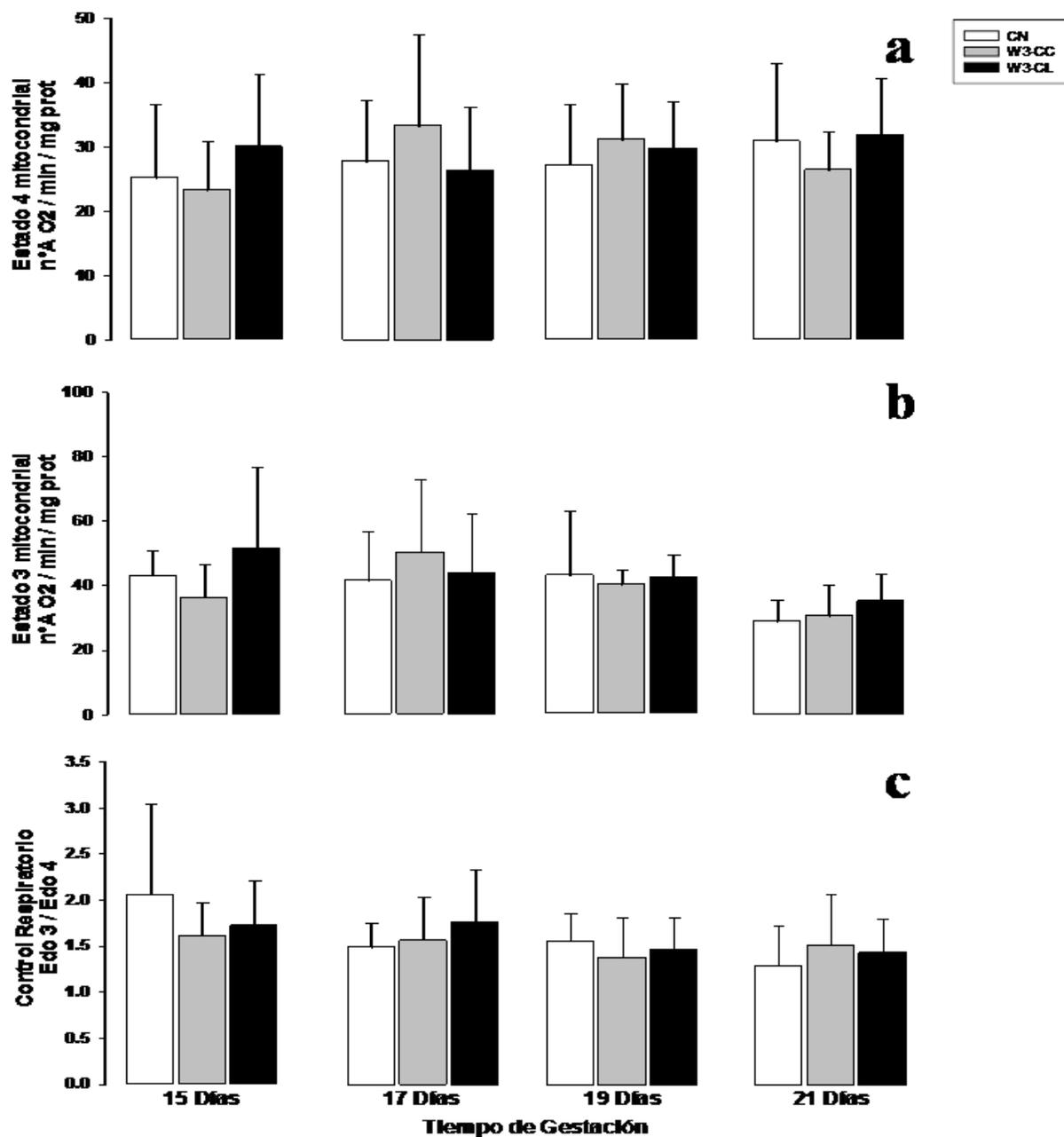


Figura 12. Consumo de oxígeno [Edo 3 (a), Edo 4 (b) y CR (c)] en mitocondrias de placenta, ratas Wistar suplementadas con ácidos grasos omega-3 durante la gestación.

Ratas control (CN), ratas con suplemento ALA (ω -3-CC) y ratas con suplemento de DHA y EPA (ω -3-CL).
 n = 6.

8 DISCUSIÓN

Durante la gestación se producen una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos en la hembra con la finalidad de dar soporte nutricional tanto al feto como a su placenta, para que estos se desarrollen y crezcan, todo ello sin perjuicio de la madre. Lo anterior se puede definir como un sistema de homeorresis, donde el balance metabólico de la madre se encuentra en negativo (catabólico), mientras que el del feto es netamente positivo (anabólico). Es importante señalar que durante esta etapa la evaluación periódica del estado de salud materno es fundamental para una gestación saludable.

Existen muchas causas por las cuales la vida del complejo materno-fetal se encuentra en riesgo, entre ellas se pueden destacar las complicaciones derivadas de enfermedades metabólicas maternas, pre gestacionales o durante la gestación como son: diabetes mellitus tipo 2, hipertensión (preeclampsia, eclampsia), desnutrición y, sobrepeso u obesidad.

Los resultados del presente estudio se dividen en: a) *parámetros fisiológicos de la madre*; con los cuales se avalúa la salud materna, b) *parámetros morfométricos del feto*; para evaluar desarrollo y crecimiento fetal, c) *parámetros morfométricos de la placenta*; para evaluar desarrollo y crecimiento de este órgano y d) *consumo de oxígeno mitocondrial de células de placenta*; con la finalidad de evaluar el estado celular de la placenta, ya que esta juega un papel fundamental, no sólo en el aporte de nutrientes y oxígeno al feto, sino además regula el metabolismo intermedio materno a través de la síntesis y regulación hormonal. Es por ello que la discusión de este estudio se realizará abordando cada uno de los anteriores apartados de forma independiente y se finalizará con el análisis integral de la información.

8.1 Parámetros fisiológicos de la madre

En el presente estudio se evaluó la ganancia de peso de hembras en gestación con diferentes esquemas de tratamiento los cuales incluyen la suplementación de ácidos grasos omega 3 de cadena corta (ω -3-CC) y larga (ω -3-CL) a diferentes momentos de la

gestación. Cabe mencionar que los días seleccionados para la valoración de la madre y la toma de muestras tienen la intención de hacer una secuencia que se asemeje a los momentos claves del crecimiento fetal del humano.

Como se puede observar en la figura 5a existe una ganancia de peso de 130 g en el grupo de ratas control lo que significa una diferencia de 2.31% y 10% más, comparado con los grupo ω -3-CC y ω -3-CL respectivamente. Mucho se ha sugerido acerca de los efectos que tienen estos ácidos grasos poliinsaturados en diferentes sistemas tanto metabólicos como hormonales, uno de ellos es el eje hipotálamo-placentario donde la hormona leptina juega un papel preponderante en la regulación de la implantación, desarrollo embrionario y crecimiento fetal, además de los efectos en la regulación de la saciedad, lo que la ha convertido en uno de los blancos de estudio para el tratamiento del sobrepeso y la obesidad (Morales y Carvajal, 2010).

Es importante recordar que durante la gestación se pueden diferenciar dos fases en el metabolismo materno, fase inicial (primer tercio de la gestación) principalmente anabólica y fase terminal (segundo y tercer tercios de la gestación) predominantemente catabólica, es decir, primero hay una acumulación de grasa como resultado de la hiperfagia, la lipogénesis y la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL) y al final disminuye el almacenamiento y se activa la utilización de las reservas (Purizaca, 2010), efecto que se ve reflejado en la ganancia de peso de las ratas durante los dos primeros tercios de la gestación (15 días) la cual es hasta 4.6 veces menor que el peso alcanzado al final de la gestación en los animales del grupo control y 3.05 (ω -3-CC) y 2.44 (ω -3-CL) veces menor en los grupos suplementados con ácidos grasos omega-3. El metabolismo lipídico juega un papel central en las adaptaciones metabólicas de la madre durante la gestación y tienen como finalidad garantizar un adecuado aporte de nutrientes hacia el feto (Herrera y Álvarez, 2008). El peso corporal puede aumentar en función de varios factores como: el incremento de las reservas energéticas de la madre (durante el primer trimestre de gestación) y el aumento de la masa celular del producto y sus faneras (membrana amniótica y membrana alantoidea), el contenido líquido de las membranas fetales y la placenta (durante los dos últimos trimestres de la gestación) (Zonana-Nacach *et al.*, 2010).

Por otro lado la vigilancia periódica de los indicadores bioquímicos del metabolismo de los carbohidratos y los lípidos (colesterol y sus fracciones), así como el monitoreo de la glicemia basal o las pruebas de tolerancia a esta molécula son de suma importancia para el mantenimiento de la salud materno-infantil durante la gestación. Durante el presente estudio se monitoreo la concentración de glucosa basal en 5 diferentes puntos (0.5, 15, 17, 19 y 21 días) de la gestación, atendiendo a lo ya mencionado respecto a los tiempos o periodos de importancia del curso de la gestación humana. La literatura señala que uno de los principales problemas que se presentan durante la gestación respecto al metabolismo de la glucosa es el desarrollo de diabetes gestacional, condición relacionada a la síntesis y acción de las hormonas placentarias. Como se puede observar en la figura 5b la concentración basal de glucosa en sangre de los animales de los grupos en estudio se mantiene dentro de un rango equivalente a la glicemia basal reportada como normal en machos de rata Wistar sanos (80 a los 90 mg/dL). Existen pocos estudios del perfil glicémico basal en ratas hembra vacías; sin embargo, Figueroa-García *et al.* (2013) reportan concentraciones de 5.1 ± 0.88 mmol/L (85 a 105 mg/dL) y de 5.6 mmol/L (100 mg/dL) en animales gestantes. Por otro lado es necesario evaluar las pruebas de tolerancia a la glucosa para formular conclusiones acerca del metabolismo de la glucosa durante la gestación, los resultados de esta prueba se presenta en la figura 6, en donde se puede observar que el patrón de las curvas de los animales con tratamiento de ácidos grasos omega 3 de cadena corta y larga presentan un menor valor en los diferentes tiempos (minutos) evaluados desde los 15 y hasta los 21 DG, sin llegar a ser considerados como hipoglicemia en ninguno de los casos. Pese a que las pruebas no son contundentes para el diagnóstico de hipoglicemia se puede observar una clara modificación en los valores de los grupos tratados respecto al control, valores que sugieren una alteración en el metabolismo de la glucosa materna, misma que puede tener repercusiones en el desarrollo y bienestar de la placenta y el feto, por lo que es de suma importancia mantenerse atentos a los efectos de estas moléculas en mujeres gestantes.

Es importante señalar que la proliferación de las células β pancreáticas en condiciones fisiológicas basales en el adulto se realiza a ritmos muy lentos (Teta *et al.*, 2005; Pearl *et al.*, 2010); sin embargo, existen estudios que demuestran la existencia de una plasticidad adaptativa de este tipo celular en condiciones fisiológicas en las que hay un aumento en

la demanda metabólica, como es el embarazo, por lo que durante esta etapa existe un aumento transitorio de la tasa de proliferación y masa de las células beta de los islotes pancreáticos (Teixeira *et al.*, 2019), lo que sumado al incremento en la síntesis y liberación de insulina por la estimulación de los ácidos grasos omega 3 a las células beta se tiene como consecuencia una sobrecarga de insulina en la circulación materna generando una hiperinsulinemia que puede derivar a un síndrome de resistencia a la insulina (Scaglia *et al.*, 1995) lo que se vería reflejado, en un principio, como una hipoglicemia misma que se demuestra con los resultados obtenidos en el presente estudio en los grupos que recibieron tratamiento con estos ácidos grasos poliinsaturados (figura 6); mientras que el grupo control presenta una ligera disminución de la concentración de glucosa generada por la insulinemia característica de la gestación (Ernst *et al.*, 2011).

8.2 Parámetros morfométricos del feto

8.2.1 Peso fetal

El peso, la longitud y el perímetro craneal son los parámetros zoométricos más usados para valorar el crecimiento fetal. Existen diversos factores que afectan el peso y la longitud del feto entre ellos se encuentran: el tamaño de la camada, la posición del feto en el cuerno uterino (Barr *et al.*, 1970), el sexo del feto (Bruce y Norman, 1975) y el peso de la placenta (Norman y Bruce, 1979a y b). En el presente estudio se evaluaron tanto el peso como la longitud de los fetos de ratas Wistar a diferentes edades de gestación con la finalidad de estudiar el efecto que tienen los ácidos grasos poliinsaturados omega 3 de cadena corta y larga sobre estos parámetros, encontrando que existe una diferencia matemática entre los grupos sólo al final de la gestación (día 21) donde el peso alcanzado es de 5.02 ± 0.87 , CN; 5.45 ± 0.4 , ω -3-CC y 4.89 ± 0.99 , ω -3-CL. El incremento de peso de 26.8 % en el grupo ω -3-CC comparado con el grupo control a los 21 días de edad gestacional este fenómeno talvez se deba al incremento en la síntesis y liberación de la insulina materna derivada de la estimulación de este ácido graso sobre las células beta del páncreas (Orozco, 2008). Estudios realizados por Norman y Bruce (1979) para

evaluar algunos parámetros zoométricos como el peso fetal en ratas a diferentes edades de gestación muestra que el peso a los 17 (0.38 g) (Norman y Bruce, 1979b) y 22 (5.4 0.7 g) (Norman y Bruce, 1979a) días es 65.4 y 8.4% menor que el de los animales del grupo control del presente estudio, esto se puede explicar debido a que algunas de las variables que influyen en el desarrollo y ganancia de peso de los fetos es la edad de la hembra al momento de la gestación, la cual en el caso de los grupos utilizados para el desarrollo del presente estudio fue de 4 meses; mientras que la reportada por los autores de “Fetal and placental weight relationships in the rat at Days 13 and 17 of gestation” oscila entre los 3 a 5 meses, lo que puede llevar a tener un amplio rango en el valor de esta variable. Otros autores como Furukawa (2019) señalan que el peso alcanzado por los fetos de ratas a los 15 (0.26 mg), 17 (0.85 mg), 19 (2.06 mg) y 21 (4.96 mg) días de gestación es 29.7% mayor a los 15 días y tiende a disminuir en porcentaje de los 17 a los 21 días en comparación con el grupo control en estudio. Además de las variables antes mencionadas el estado nutricional de la madre y el número de partos son otros de los factores que determinan la ganancia de peso del feto, esto sin contar con el número de crías por parto, antecedentes genéticos y factores ambientales. El crecimiento prenatal aumenta progresivamente con la edad gestacional, como se puede apreciar en la figura 7, sin embargo el que un feto sea más pequeño y liviano no significa necesariamente que su crecimiento se haya retrasado o que sea menos maduro de lo esperado para la edad gestacional (Chahoud y Paumgarten, 2005).

8.2.2 Talla fetal(distancia céfalo-caudal)

Hace un siglo que Stockard (1921) demostró que al alterarse las condiciones del entorno fetal se podía modificar el crecimiento, en especial cuando estas alteraciones se realizan en periodos específicos de la gestación. El crecimiento fetal y la etapa de lactancia determinan la salud del individuo a lo largo de la vida (Redondo *et al*, 2013), es por ello que es de primordial importancia evaluar los efectos que ciertas moléculas tienen sobre este parámetro.

El crecimiento es variable a lo largo de la vida, esta variabilidad es mayor de acuerdo a las diferencias metabólicas y funcionales de los distintos tejidos y sistemas. El crecimiento de los individuos es discontinuo y existe una serie de características que pueden alterarlo; ya sea acelerándolo o disminuyéndolo. Existen diversas causas que pueden alterar el crecimiento en la etapa fetal, algunas de origen materno como son: enfermedades metabólicas, mala nutrición o restricción alimenticia durante el embarazo, edad, etc. o atribuibles al feto y la placenta: número de fetos por camada, sexo, disfunción placentaria, etc.

En el presente trabajo se investigó el efecto de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de cadena corta y larga sobre el crecimiento fetal (talla), los resultados no muestran evidencia de alteración en este parámetro a causa de la suplementación de estas moléculas durante la gestación (figura 7b); sin embargo, al analizar los datos tanto del peso fetal como de la talla en forma conjunta calculando el índice de masa corporal (IMC), observamos que este es mayor en los hijos de las madres que recibieron suplementación con estos ácidos grasos (figura 7c). El IMC es un indicador del estado nutricional que sirve para identificar el sobrepeso o la obesidad, además de ser un predictor de la morbimortalidad de esta enfermedad (Manson *et al*, 1995; Willett *et al*, 1999); sin embargo, muy poco se sabe acerca de este parámetro en la etapa fetal. Existen estudios que relacionan el bajo peso al nacer con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y metabólicas en el adulto y la importancia que el consumo de ácidos grasos omega-3 tiene en la prevención de la presentación en estos padecimientos (Skilton, 2018), ya que en la mayoría de estos individuos, independientemente del consumo de estas moléculas, la concentración de ácidos grasos n-3 de cadena larga es baja, lo que se relaciona con la actividad de la 5-desaturasa, enzima que se encarga de la conversión de los n-3 de cadena corta a n-3 de cadena larga (Ozanne *et al.*, 1998). Por otro lado la macrosomía fetal está relacionada con complicaciones perinatales y el desarrollo de enfermedades metabólicas como el sobre peso y la obesidad en el infante, derivada de alteraciones metabólicas, como en la concentración de insulina y glucosa (Schwartz y Teramo, 1999; Hjalgrim *et al.*, 2003). Es posible que el consumo de los ácidos grasos omega-3 durante la gestación tenga un efecto preventivo en el desarrollo de enfermedades en la edad adulta en individuos hijos de madres con enfermedades metabólicas previas o

desarrolladas durante la gestación ya que ayuda a tener un mejor IMC; sin embargo, podría ser un factor de riesgo en individuos sanos, ya que tiene efectos positivos en este índice y puede conducir a individuos con macrosomías y posterior desarrollo de enfermedades.

8.3 Parámetros morfométricos de la placenta

La placenta es un órgano transitorio con una gran variedad de funciones que van desde la nutrición y oxigenación hasta la eliminación de los desechos fetales, y juega un papel fundamental en el crecimiento fetal. El examen de este órgano puede ayudar a dilucidar la causa u origen de los problemas fetales; sin embargo, este órgano es poco estudiado, y con menor incidencia en los diferentes estadios de su desarrollo, debido a las complicaciones que tiene su obtención, y, sobre todo en humanos. El desarrollo de la placenta, evaluado como incremento en peso y talla, así como las funciones de este órgano están correlacionadas de forma directa con la viabilidad del producto y los problemas que este pueda tener durante la gestación (estrés fetal agudo, sufrimiento fetal, peso al nacimiento), al parto (prematuros, dismaduros, inmaduros) o durante la edad adulta (enfermedades metabólicas). Se sabe que tanto el desarrollo como la función de la placenta se asocian a variables maternas como: edad a la gestación, número de partos, estado de salud, altura y peso de la madre, concentración de ferritina sérica, entre otros (Hindmarsh *et al.*, 2000).

8.3.1 Peso

Los datos encontrados en la literatura reportan un menor peso en las placentas de ratas Wistar sanas sin tratamientos [15 días, 31.4%; 17 días, 22.7%; 19 días, 19.5% y 21 días, 36.9% (Furukawa *et al.*, 2019)] en comparación con el grupos control de este estudio. Estos resultados son más parecidos a los encontrados en los grupos suplementados con ω -3-CC (15, 17 y 19 DG) y ω -3-CL (21 DG), lo que probablemente se deba a que la mayoría de las fórmulas de alimento para rata son complementadas con un aporte de

ácidos grasos que rebasa las recomendaciones de la National Research Council (NRC) para esta especie. Un peso placentario alto está asociado a baja puntuación APGAR, dificultad para respirar y muerte perinatal, por otro lado el bajo peso de la placenta está directamente relacionado con complicaciones en la salud materna.

8.3.2 Talla (diámetro y grosor)

El aumento en el tamaño de la placenta está asociado al peso de la madre y es una de las variables asociadas al peso del recién nacido. En el presente estudio los datos encontrados muestran una diferencia matemática del 12%, ω -3-CC y 7%, ω -3-CL, y pese a que este valor parece recuperarse a los 17 días, 2.6% y 19 días, 0.9 % días en el grupo ω -3-CL vuelve a disminuir 4.6 % a los 21 días, mientras que el grupo ω -3-CC permanece por debajo del control durante el resto de la gestación (0.7 %; 17 D, 1.8 %; 19 D y 7.1 %; 21 D). Es importante señalar que el menor diámetro placentario obtenido es el del grupo ω -3-CL; sin embargo, los datos observados en la variable grosor son similares a los del diámetro a los 15DG (19.8 %, ω -3-CC y 12.3%, ω -3-CL) pero tienden a ser mayores durante el resto de la gestación donde el grosor de la placenta es mayor en los grupos tratados respecto al control. Comparando los valores diámetro y grosor entre los grupos en tratamiento se puede observar que el grupo ω -3-CL es más grande lo que se correlaciona en forma positiva con el peso de la placenta. Los datos evidencian la existencia de una alteración en el crecimiento de este órgano en los grupos suplementados si se comparan con el comportamiento del grupo control, este fenómeno puede estar afectando el crecimiento fetal, por lo que se debe evaluar la eficiencia placentaria.

8.4 Índice de eficiencia Placentaria (IEP) e Índice de masa corporal del feto (IMC)

Este parámetro ha sido poco evaluado en los diferentes estadios de la gestación en humanos debido a la falta de material biológico para hacerlo o a la ignorancia que se ha

tenido de su importancia como predictor del bienestar fetal. En el presente estudio se determinó el índice de eficiencia placentaria (figura 10) a partir del peso de la placenta y el peso fetal, encontrando que los grupos suplementados con ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de cadena corta (17 días) y larga (15 días) son 3.3% y 12.3% menores respectivamente, en comparación con el grupo control y tienden a incrementar exponencialmente hacia el final de la gestación siendo 48.8%, ω -3-CC y 20.5%, ω -3-CL mayores con respecto al grupo control a los 21 días de gestación; sin embargo, un índice de eficiencia placentaria mayor no siempre es sinónimo de bienestar fetal, ya que se ha encontrado que un IEP elevado sugiere la disminución de las reservas placentarias, lo que tiene como consecuencia la restricción del crecimiento intrauterino, lo que se puede interpretar como que las placentas pequeñas limitan el óptimo crecimiento fetal (Boyd y Hamilton, 1970; Kuhy Ben-Schlomo, 1997), mientras que el IEP bajo se asocia a anomalías de la placenta con compromiso funcional. Es importante recordar que el tamaño de la placenta, así como de sus demás características morfométricas, tanto para la función endocrina como para la transferencia de nutrientes al feto. Es así que una mayor superficie (diámetro) placentaria asegura una mayor superficie de sincitiotrofoblasto y un mayor espesor asegura una mayor formación de vasos sanguíneos y lagunas placentaria con una mayor disponibilidad de nutrientes al feto (Sibley, 1994).

Como ya se mencionó el peso al nacimiento es un indicador de la nutrición fetal; sin embargo este parámetro, en forma cruda, no siempre sugiere la buena salud del neonato y mucho menos del feto intrauterino, por lo que es necesario evaluar uno de los parámetros morfométricos más utilizados para el diagnóstico del estado nutricional (obesidad, peso saludable o bajo peso al nacer) de los individuos natos, nos referimos a el índice de masa corporal el cual es 13.6 y 16.8 % mayor en los animales de los grupos suplementados (ω -3-CC y ω -3-CL respectivamente) comparados con el grupo control a los 15 DG y 7.7%, ω -3-CC y 6.6%, ω -3-CL menor hacia el final de la gestación. El incremento de este parámetro respecto al tiempo (entre los 15 y 21 DG) es de 1.2 (135.5%) y 1.15 (132.9%) veces más en los grupos tratados respecto al control, lo que sugiere que hay un efecto positivo de los ácidos grasos sobre el crecimiento fetal. Este mismo efecto se ha observado en individuos suplementados en la etapa de crecimiento

(entre las 8 semanas y los 6 meses) (Vicenteño, 2018). El IMC a diferencia del llamado percentil fetal se aproxima más a la realidad en cuanto a desarrollo intrauterino se refiere; sin embargo, y debido a que no es posible realizar la medición del IMC en el feto lo adecuado es el cálculo del percentil fetal (PF) evalúa el desarrollo fetal a lo largo del embarazo y se realiza mediante la determinación del tamaño aproximado de tres parámetros que son: el Diámetro biparietal, el perímetro del abdomen y la longitud del fémur, por lo que quizás sea adecuado en próximas investigaciones determinar estos parámetros en los fetos para realizar una comparación adecuada entre el PF y el IMC y estimar su grado de asociación en las distintas etapas del crecimiento de los fetos de rata.

8.5 Reabsorciones y molas

En gestaciones sanas el tejido trofoblástico desarrolla una rica vasculatura que, en mamíferos, invade el endometrio materno; lo que se conoce como placenta, ocasionalmente los mecanismos de regulación génica fallan dando lugar a la formación de pequeñas masas de agregados celulares de color amarillento halladas después de la implantación (Durón y Bolaños, 2018), estas estructuras se forman por la muerte fetal temprana derivada de: a) una falta de aporte energético (hipoglicemia), producida por una privación del aporte materno debido a una deficiente perfusión placentaria, b) por hiperinsulinemia materna o fetal o c) hipocalcemia (hipotiroidismo). En el presente estudio se encontró que el mayor número de molas se presentó en el grupo ω -3-CL (40%) mientras que en los grupos control y el ω -3-CC sólo se observaron en el 27% de los animales. Estas molas se dividen de acuerdo a su histología en: formas premalignas que a su vez se dividen en la mola hidatiforme parcial (observada en el 100% del grupo control y el 80% en el grupo ω -3-CC), la mola hidatiforme completa (presente en el 20% de los casos del grupo ω -3-CC y en el 30% del grupo ω -3-CL) y la mola invasiva (observada en el 60%, ω -3-CC y 10%, ω -3-CL) y el tumor trofoblástico epitelioide presente en el grupo ω -3-CL.

Estudios realizados por el grupo de Mejía-Zepeda R en animales inducidos a diabetes tipo 2 con estreptozotocina se ha observado el desarrollo de tumores en riñón en el 60% de la población de animales suplementados con ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga estos datos se corresponden con el desarrollo de molas hidatiformes completas (30%), invasivas (60%) y tumor trofoblástico epitelioides (10%) del grupo que recibió este tipo de suplementación. Es importante señalar que el desarrollo de tumores ha sido asociado a la obesidad, diabetes tipo 2 y resistencia a la insulina debido al incremento de la concentración de insulina en la circulación lo que promueve el crecimiento y progresión de las células displásicas (Calle y Kaaks, 2004; Wolf *et al*, 2005). Además de lo anterior Gallagher y LeRoith (2010) informa de la existencia de un mayor riesgo de desarrollo de cáncer relacionado con hiperinsulinemia secundaria a la resistencia a la insulina en personas con diabetes tipo 2 y obesidad derivado del incremento de la expresión del gen del factor de crecimiento parecido a insulina (IGF, por sus siglas en inglés), lo que se ha reportado en crecimiento tumoral en cultivo celular, modelos en animales y humanos.

8.6 Consumo de oxígeno mitocondrial de células de placenta

En el presente estudio se analizó el consumo de oxígeno mitocondrial mediante el cálculo del control respiratorio (CR), con la finalidad de evaluar la respuesta metabólica del tejido hepático y placenta cuando existe un aporte extra de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de cadena corta ó larga en la dieta materna, encontrando que en el hígado de los animales del grupo ω -3-CC existe una disminución del CR en los días 15 y 17 de la gestación (30.9 % y 17.3 % respectivamente) con un incremento a 10.2 y 9.4% a los días 19 y 21, mientras que en los animales del grupo ω -3-CL hay una disminución de este parámetro a lo largo de la gestación (34, 16, 4.6 y 0.2%). Comparando los anteriores datos con los de la placenta, tanto en el grupo ω -3-CC [al inicio (15 días) es menor comparado con el CN, incrementándose al final de la gestación] como el ω -3-CL [se mantiene por debajo del grupo control], se puede observar que el metabolismo celular se va adecuando a los cambios fisiológicos ocurridos durante la gestación. Los valores de 2.2 y 2.1 (15 DG) del CR van disminuyendo progresivamente hasta 1.4 y 1.3 (21DG) en

hígado y placenta respectivamente lo que corresponde con la demanda energética (dependiente del aporte de sustratos) de la etapa gestacional y se correlacionan de manera negativa con el crecimiento fetal y de la placenta, lo que significa una adecuada hiperplasia e hipertrofia para la formación de materia orgánica (Acevedo *et al.*, 2008). Como ya se sabe la placenta es un tejido que tiende a involucionar a medida que la gestación avanza por lo que los datos encontrados son consistentes con los cambios anatómico fisiológicos de este órgano. Uno de los cambios esperados durante la ontogénesis de la placenta (proceso de maduración e involución) es el consumo de oxígeno mitocondrial que está asociado no sólo a la función del órgano sino además a su masa, esto es a mayor número de células mayor consumo de oxígeno, cabe aclarar que este se refiere al volumen no a la eficiencia en la utilización del mismo, ya que un CR bajo indica un desacoplamiento mitocondrial derivado de: la eficiencia en el uso de sustratos y la función del sistema del transporte de electrones, el envejecimiento celular (edad gestacional), el estado nutricional de la madre y la concentración de oxígeno perfundido hacia la placenta (Sferruzzi-Perria *et al.*, 2019).

Como se puede observar, cada uno de los parámetros estudiados aporta sólo un poco de la información necesaria para el análisis, no sólo de la salud de la unidad materno fetal, sino además de los efectos que los ácidos grasos poliinsaturados tanto de cadena corta como larga pueden tener en el desarrollo y crecimiento del feto y las posibles complicaciones que pueden derivar del uso crónico de los mismos durante la gestación. El análisis de la correlación de los parámetros en estudio ofrece un panorama más claro y amplio de la implicación del consumo de los omega-3 en diferentes etapas de la gestación, encontrando que existe una correlación positiva entre el tiempo de gestación (15, 17, 19 y 21 días), con el peso del feto y su placenta ($R= 0.83$), la eficiencia placentaria ($R= - 0.76$), la presencia de molas ($R= 0.68$) y el CR ($R= - 0.89$). Estos datos se pueden interpretar como una mayor ganancia de peso, una disminución de la eficiencia placentaria y el CR en los hijos de madres suplementadas, lo que puede derivar en problemas perinatales, incremento del desarrollo de tumores y enfermedades metabólicas del adulto, entre otras patologías que ponen en riesgo la vida. Por ello es de suma importancia el estudio integral del uso de estas moléculas durante la gestación

normal y patológica con la finalidad de evaluar qué tan eficaz y recomendable es su uso en las diversas situaciones y etapas de la gestación.

9 CONCLUSIONES

- El suministro de ácidos grasos omega 3 durante la gestación, tanto de cadena corta (ω -3-CC) como de cadena larga (ω -3-CL), alteró parcialmente la ganancia de peso de la madre.
- La gestación *per se* ya representa una condición que impone dificultades al control de la glicemia materna, pero el suministro de ácidos grasos omega 3, tanto de cadena corta como larga, impone nuevas dificultades a dicho control, de acuerdo con las curvas de tolerancia a la glucosa.
- Los parámetros morfométricos de los fetos no fueron afectados por el suministro de los ácidos grasos omega 3.
- Hacia el final de la gestación (día 21), los ácidos grasos omega 3 de cadena corta y larga disminuyeron parcialmente el peso y diámetro de la placenta.
- La eficiencia placentaria y el IMC aumentaron hacia el final de la gestación (21 días) gracias al suplemento de los ácidos grasos omega 3, tanto los de cadena corta como larga.
- El suministro de los ácidos grasos omega 3, tanto de cadena corta como larga, sólo generó pequeños cambios marginales en las velocidades de consumo de oxígeno y el control respiratorio.
- En general, podemos decir que el suministro de ácidos grasos omega 3 durante el embarazo, afecta el desarrollo normal de la gestación. Sin embargo, hacen falta más estudios para comprender mejor si dichos cambios son perjudiciales o benéficos para la madre y el producto.

10 FUENTES DE INFORMACIÓN

- Acevedo GS, Espino SS, Gallardo GJM, Velasquez TB, Camargo ML y Guzman HME (2008). La placenta humana: Revisión. *Perinatología y Reproducción Humana*.(22):230-245.
- Barr M, Jensch RP and Brent RL (1970). Prenatal growth in the albino rat: effects of number, intrauterine position and resorptions. *American Journal of Anatomy*. (128): 413-428.
- Barrera RR y Fernández CLA (2015). Programación metabólica fetal. *Perinatología y Reproducción Humana*. 29(3): 99-105.
- Bauer MK, Harding JE, Bassett NS, Breier BH, Oliver MH, Gallaher BH and Gluckman P D (1998). Fetal growth and placental function. *Molecular and cellular endocrinology*. 140 (1-2): 115-120.
- Boyd J. and Hamilton W. 1970. General description of specimens: statistics of placental growth. In: *The Human Placenta*. Cambridge, England: W. Heffer&Sons, Ltd. P. 112.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 72(1-2): 248-254.
- Bringas A. S. y Baleón P. F. 2014. ¿Qué sabemos de la incidencia de la morbilidad materna en México? *Género y Salud en Cifras*. 12(1): 3-14).
- Bruce N. W. and Norman N. 1975. Influence of sexual dimorphism on foetal and placental weights in the rat. *Nature*. 257(5521): 62-63.
- Calle E. E. and Kaaks R. 2004. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nature Reviews Cancer*. (4): 579-591.
- Chahoud I. and Paumgarten F. J. R. 2005. Relationship between fetal body weight of Wistar rats at term and the extent of skeletal ossification. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*.(38): 565-575
- Church M. W., Jen K. L., Anumba J. L. I., Jackson D. A., Adams B. R. and Hotra J. W. 2010. Excess omega-3 fatty acid consumption by mothers during pregnancy and lactation caused shorter life span and abnormal ABRs in old adult offspring. *Neurotoxicology and teratology*. 32(2): 171-181.

- Díaz P., Powell T. L. and Jansson T. 2014. The role of placental nutrient sensing in maternal-fetal resource allocation. *Biology of Reproduction*. 91(4): 1-10.
- Durón R. y Bolaños P. 2018. Enfermedad Trofoblástica Gestacional. *Medicina legal de Costa Rica*. 35(1): 30-43.
- Enders A. C. and Carter A. M. 2006. Comparative placentation: some interesting modifications for histotrophic nutrition-a review. *Placenta*. 27(20): 11-16.
- Ernst S., Demirci C., Valle S., Velazquez-García S. and García-Ocaña A. 2011. Mechanisms in the adaptation of maternal β -cells during pregnancy. *Diabetes Management*. 1(2): 239-248.
- Figueroa-García M. del C., Pérez I. H., and Mejía-Zepeda R. (2013). Characterization of a type 2 diabetes model in female Wistar rats. *Revista MVZ Córdoba*. 18(Supl): 3699-3707.
- Figueroa-García M. del C., Espinosa-García M. T., Martínez-Montes F., Palomar-Morales M., and Mejía-Zepeda R. 2015. Even a chronic mild hyperglycemia affects membrane fluidity and lipoperoxidation in placental mitochondria in wistar rats. *PloS one*. 10 (12): e0143778.
- Furukawa S., Kuroda Y. and Sugiyama A. 2014. A comparison of the histological structure of the placenta in experimental animals. *Journal of toxicologic pathology*. 27(1): 11-18.
- Furukawa S., Tsuji N. and Sugiyama A. 2019. Morphology and physiology of rat placenta for toxicological evaluation. *Journal of toxicologic pathology*. (32): 1-12.
- Gallagher E. J. and LeRoith D. 2010. The proliferating role of insulin and insulin-like growth factors in cancer. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 21(10): 610-618.
- Herrera E. y Álvarez M. P. R. 2008. Papel del tejido adiposo, sensibilidad insulínica e ingesta lipídica en la gestación y su implicación en el riesgo de padecer diabetes en la edad adulta. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*.
- Herring S. J. y Oken E. 2010. Ganancia de peso durante el embarazo: Su importancia para el estado de salud materno-infantil. *Annales Nestlé* (Ed. Española). 68(1): 17-28.

- Hindmarsh P. C., Geary M. P., Rodeck C. H., Jackson M. R. and Kingdom J. C. 2000. Effect of early maternal iron on placental weight and structure. *Lancet*. 356(9231): 719-723.
- Hjalgrim L. L., Westergaard T., Rostgaard K., Schmiegelow K., Melbye M., Hjalgrim H. and Engels E. A. 2003. Birth weight as a risk factor for childhood leukemia: a meta-analysis of 18 epidemiologic studies. *American Journal of Epidemiology*. (158): 724-735.
- Jones M. L., Mark P. J. and Waddell B. J. 2014. Maternal dietary omega-3 fatty acids and placental function. *Reproduction*. 147(5): R143-R152.
- Joshi S., Rao S., Golwilkar A., Patwardhan M. and Bhonde R. 2003. Fish oil supplementation of rats during pregnancy reduces adult disease risks in their offspring. *The Journal of nutrition*. 133(10): 3170-3174.
- Kuh D. and Ben-Schlomo Y. 1997. Life Course Approach to Chronic Disease Epidemiology. Oxford: Oxford University Press.
- Leiser R. and Kaufmann P. 1994. Placental structure: in a comparative aspect. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*. 102(2): 122-134.
- Leyva-Rendón A. 2011. DHA y funcionamiento cerebral: ¿Cuáles son los beneficios? *Revista Mexicana de Neurociencia*. 12(6): 365-372.
- Manson J. E., Willet W. C., Stampfer M. J., Colditz G. A., Hunter D. J., Hankinson S. E., Hennekens C. H. and Speizer F. E. 1995. Body weight and mortality among women. *New England Journal of Medicine*. (333): 667-685.
- Morales C. M. y Carvajal G. F. 2010. Obesidad y resistencia a la leptina. *Gaceta Médica Boliviana*. 33(1): 63-68.
- Morales J., Valenzuela R., González D., González M., Tapia G., Sanhueza J. y Valenzuela A. 2012. Nuevas fuentes dietarias de ácido alfa-linolénico: una visión crítica. *Revista chilena de nutrición*. 39(3):79-87.
- National Institutes of Health. Ácidos grasos omega-3. Recuperado de: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Omega3FattyAcids-DatosEnEspañol/>
- Norma Oficial Mexicana NOM 062-ZOO-1997-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. SENASICA. Ciudad de México. 6 de diciembre 1999.

- Norman N. A. and Bruce N. W. 1979a. Fetal and placental weight relationships in the albino rat near term. *Teratology*. (19): 245-250.
- Norman N. A. and Bruce N. W. 1979b. Fetal and placental weight relationships in the rat at days 13 and 17 of gestation. *Reproduction*. 57(2): 345-348.
- Orozco T. R. 2008. Efecto de los ácidos grasos omega 3 (FA w-3) y linoleico conjugado (CLA) en la diabetes mellitus 2 (DM2) en ratas wistar. (Tesis de Licenciatura). México: UNAM.
- Ozanne S. E., Martensz N. D., Petry C. J., Loizou C. L. and Hales C. N. 1998. Maternal low protein diet in rats programmes fatty acid desaturase activities in the offspring. *Diabetología*. (41): 1337-1342.
- Pearl S., Kushner J. A., Buchholz B. A., Meeker A. K., Stein G. M., Hsieh M., Kirby M., Pechold S., Liu E. H., Harlan D. M. y Tisdale J. F. 2010. Significant human β -cell turnover is limited to the first three decades of life as determined by *in vivo* thymidine analog incorporation and radiocarbon dating. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. (95): E234-E239.
- Percy P., Vilbergsson G., Percy A., Mansson J. E., Wennergren M. and Svennerholm L. 1991. The fatty acid composition of placenta in intrauterine growth retardation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*. 1084(2): 173-177
- Purizaca M. 2010. Modificaciones fisiológicas en el embarazo. *Revista peruana de Ginecología y Obstetricia*. 56819: 57-69.
- Redondo F. C. G., Santamaria P. A., Mazaira S. J., Ortiz O. M. R. y De Rufino R. P. M. 2013 Crecimiento fetal, nutrición de la embarazada y teoría del *programming* fetal. *Boletín de pediatría*. (53): 2-12.
- Roa I., Smok C. y Prieto R. 2012. Placenta: Anatomía e histología comparada. *International Journal of Morphology*. 30(4): 1490-1496.
- Sanhueza C. J., Durán A. S. y Torres G. J. 2015. Los ácidos grasos dietarios y su relación con la salud. *Nutrición Hospitalaria*. 32(3): 1362-1375.
- Scaglia L., Smith F. E. and Bonner-Weir S. 1995. Apoptosis contributes to the involution of β cell mass in the post partum rat pancreas. *Endocrinology*. (136): 5461-5468.

- Schwartz R. and Teramo K. A. 1999. What is the significance of macrosomia? *Diabetes Care.* (22):1201-1205.
- Sferruzzi-Perri A. N., Higgins J. S., Vaughan O. R., Murray A. J. and Fowden A. L. 2019. Placental mitochondria adapt developmentally and in response to hypoxia to support fetal growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 116(5):1561-1626.
- Sibley C. 1994. The pregnant woman. In *Human Physiology: Age, Stress and the Environment* (eds. Case RM, Waterhouse JM). Oxford University Press: Oxford. pp. 3-27
- Sinclair A. J., Attar-Bashi N. M. and Li D. 2002. What is the role of α -linolenic acid for mammals? *Lipids.*37(12): 113-1123.
- Skilton M. R. 2018. ω -3 Fatty Acids, Impaired Fetal Growth, and Cardiovascular Risk: Nutrition as Precision Medicine. American Society for Nutrition. *Advances in Nutrition.*(9):99-104.
- Soares M. J., Varberg K. M. and Iqbal K. 2018. Hemochorial placentation: development, function and adaptations. *Biology of reproduction.* 99(1): 196-211.
- Stockard C. R. 1921. Developmental rate and structural expression: An experimental study of twins, "double monsters" and single deformities, and the interaction among embryonic organs during their origin and development. *American Journal of Anatomy.*(28): 115-275.
- Takata K., Fujikura K. and Shin B. C. 1997. Ultrastructure of the rodent placental labyrinth: a site of barrier and transport. *Journal of reproduction and development.* 43(1): 13-24.
- Tamayo L. T., Couret C. M. P. A. J. 2014. Alteraciones morfológicas de la placenta. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología.* 40(3): 342-348.
- Teta M., Long S. Y., Wartschow L. M., Rankin M. M. and Kushner J. A. 2005. Very slow turnover of β -cells in age adult mice. *Diabetes.* (54): 2557-2567.
- Teixeira C. J., Santos-Silva J. C., de Souza D. N., Rafacho A., Anhe G. F., Bordin S. 2019. Dexamethasone during pregnancy impairs maternal pancreatic β -cell renewal during lactation. *Endocrine connections.*8(2):120-131.

- Thornburg K. L., Kolahi K., Pierce M., Valent A., Drake R. and Louey S. 2016. Biological features of placental programming. *Placenta*. (48): S47-S53.
- Tsatsaris V., Malassiné A., Fournier T., Handschuh K., Schaaps J. P., Foidart J. M. y Evain-Brion D. 2006. Placenta humana. *EMC-Ginecología-Obstetricia*. 42(2): 1-23.
- Valenzuela R., Tapia G., González M. y Valenzuela A. 2011. Ácidos grasos omega-3 (EPA-DHA). 356-367.
- Vicenteño, M. U. 2018. Análisis de diferentes dosis de ácidos grasos omega 3 (alfa-linolénico) en fantasmas de eritrocitos de ratas inducidas a diabetes tipo 2. (Tesis de Licenciatura). México: UNAM.
- Wen Z. and Chen F. 2010. Production of eicosapentaenoic acid using heterotrophically grown microalgae. In *Single Cell Oils*. AOCS Press. pp. 151-177.
- Willet W. C., Dietz W. H. and Colditz G. A. 1999. Guidelines for healthy weight. *New England Journal of Medicine*.(341):427-434.
- Wolf I., Sadetzki S., Catane R., Karasik A. and Kaufman B. 2005. Diabetes mellitus and breast cancer. *Lancet Oncology*. (6):103-111.
- Yonekubo A., Honda S., Okano M., Takahashi K. and Yamamoto Y. 1993. Dietary Fish Oil Alters Rat Milk Composition and Liver and Brain Fatty Acid Composition of Fetal and Neonatal Rats. *The Journal of Nutrition*.123(10) 1703-1708.
- Zonana-Nacach A., Baldenebro-Preciado R. y Ruiz-Dorado M. A. 2010. Efecto de la ganancia de peso gestacional en la madre y el neonato. *Salud pública de México*. 52(3):220-225.