



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DIVISIÓN DE CIENCIAS ODONTOLÓGICAS BÁSICAS

**EFFECTO DE LA OBESIDAD INDUCIDA POR UNA DIETA ALTA EN GRASAS SOBRE
LAS GLÁNDULAS SALIVALES MAYORES DE RATAS WISTAR Y DE SU PROGENIE**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

BIÓL. DANIELA CORTÉS GUTIÉRREZ

TUTOR PRINCIPAL: DRA. VERÓNICA HAYDÉE LUGO MARTÍNEZ
DEPTO. EMBRIOLOGÍA Y GENÉTICA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. MARCO ÁLVAREZ PÉREZ

DEPEI, FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, UNAM

DRA. JANETH SERRANO BELLO

DEPEI, FACULTAD DE ODONTOLOGÍA UNAM

DRA. GARCÍA HERNÁNDEZ ANA LILIA

LAB.INVEST. ODONTOLÓGICA, FES IZTACALA, UNAM

DR. DAVID MAURICIO GIRALDO GÓMEZ

DEPTO. BIOLOGÍA CELULAR Y TISULAR, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, ABRIL 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al programa de Posgrado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud, UNAM y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca 1006016 otorgada durante mis estudios de maestría.

Agradezco al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM el cual proporcionó el financiamiento al proyecto número IN221019, bajo la responsabilidad de la Dra. Verónica Haydée Lugo Martínez y con el cual se realizó este trabajo.

Al Laboratorio Común del Departamento de Embriología y Genética donde se realizó este trabajo y a la Unidad de Microscopía de la Facultad de Medicina de la UNAM.

A la Dra. Verónica Haydée Lugo Martínez por su invaluable apoyo y asesoramiento, así como por la dirección en la elaboración de este proyecto.

Al Dr. Jose Rene Escalona Mugica, al Dr. Carlos Alfonso Larqué Velázquez por su asesoramiento, coodirección y participación a lo largo de todo el proyecto, como parte del equipo de investigadores que colaboran en el proyecto IN221019. Así como al Lic. Emiliano Granados Delgado por su participación y apoyo en los experimentos realizados para esta tesis.

A la Dra. María Cristina Piña Barba, al Dr. Mauricio David Giraldo Gómez y al Laboratorio de Biomateriales del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM por permitirnos el uso compartido de equipo para la elaboración de este trabajo.

A todo el equipo de investigación (Investigadores, tesistas, servicios sociales y AFINES) que estuvo detrás de la organización y elaboración de este trabajo.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....	6
ABREVIATURAS	8
I RESUMEN.....	9
II ABSTRACT	10
III INTRODUCCIÓN	11
3.1 Obesidad	11
3.1.1 Epidemiología de la obesidad.....	11
3.1.2 Repercusiones en la salud.....	13
3.1.3 Repercusiones en la economía	13
3.2 Tejido adiposo.....	14
3.2.1 Estructura y función fisiológica.....	14
3.2.2 Alteraciones estructurales y metabólicas en la obesidad.....	15
3.3 Programación metabólica	16
3.3.1 Mecanismos de herencia epigenética.....	16
3.3.2 Intergeneracionalidad y transgeneracionalidad.....	17
3.4 Modelos de obesidad	18
3.5 Relación de la obesidad con patologías bucales.....	18
3.6 Glándulas salivales.....	19
3.6.1 Estructura histológica de las glándulas salivales mayores	19
3.6.1.1 Glándula parótida.....	21
3.6.1.2 Glándula submandibular	21
3.6.1.3 Glándula sublingual.....	22
3.6.2 Función fisiológica	22
3.6.3 Alteraciones de las glándulas salivales asociadas a la obesidad	23
IV JUSTIFICACIÓN	25
V PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	25
VI HIPÓTESIS.....	25
VII OBJETIVOS	26
7.1 Objetivo general.....	26
7.2 Objetivos particulares	26
VIII MATERIALES Y MÉTODOS	27
8.1 Modelo biológico	27
8.1.1 Consideraciones éticas	27
8.2 Estrategia nutricional	28
8.2.1 Estandarización de la dieta alta en grasas (HFD).....	28

8.2.2	Aplicación del paradigma alimentario.....	28
8.3	Estrategia experimental.....	29
8.3.1	Estandarización del modelo de obesidad en la generación F0.....	29
8.3.1.1	Cinética de ganancia de peso.....	30
8.3.1.2	Cinética de ingesta calórica.....	30
8.3.1.3	Pruebas metabólicas.....	31
a)	Prueba intraperitoneal de tolerancia a la glucosa.....	31
b)	Prueba intraperitoneal de sensibilidad a la insulina.....	31
8.3.1.4	Eutanasia.....	32
8.3.1.5	Somatometría.....	32
a)	Circunferencia abdominal.....	32
b)	Índice de masa corporal (IMC).....	33
8.3.1.6	Obtención del plasma sanguíneo.....	33
a)	Cuantificación de leptina e insulina en plasma.....	33
b)	Cuantificación de lípidos séricos.....	34
8.3.1.7	Obtención de muestras de tejido.....	34
a)	Tejido adiposo.....	34
b)	Glándulas salivales mayores.....	34
8.3.2	Análisis histológico de las glándulas salivales mayores.....	35
a)	Tinción de Hematoxilina – Eosina (HE).....	35
b)	Tinción de Ácido Peryódico Schiff (PAS).....	36
8.3.2.1	Cuantificación de acinos.....	36
8.4	Obtención de la progenie (F1) de ratas Wistar.....	38
8.5	Evaluación del efecto intergeneracional de la obesidad parental.....	38
8.5.1	Eutanasia de F1.....	39
8.5.2	Somatometría de F1.....	39
8.5.3	Obtención de muestras de plasma y tejidos de F1.....	40
8.6	Análisis estadístico.....	40
IX	RESULTADOS.....	41
9.1	Modelo de obesidad inducida por una dieta alta en grasas (HFD) en ratas Wistar hembra y macho.....	41
9.1.1	Ganancia de peso corporal e ingesta calórica.....	41
9.1.2	Somatometría de ratas Wistar hembra y macho generación F0.....	42
9.1.3	Adiposidad de ratas Wistar hembra y macho generación F0.....	44
9.1.4	Análisis de marcadores bioquímicos de ratas Wistar hembra y macho generación F0.....	44
9.1.5	Análisis de las pruebas metabólicas de ratas Wistar hembra y macho de la generación F0.....	47
9.2	Efecto de la obesidad sobre la histología de las glándulas salivales mayores en ratas Wistar hembras y machos F0.....	50

9.2.1	Análisis del peso y la cuantificación de acinos serosos de la glándula salival parótida de ratas Wistar hembras y machos F0.....	50
9.2.2	Análisis del peso y la cuantificación de acinos serosos y mucosos de las glándulas submandibular y sublingual de ratas Wistar hembras y machos F0	51
9.2.3	Paneles con las micrografías histológicas de ratas Wistar hembra y macho F0;Error! Marcador no definido.	
9.3	Efecto intergeneracional de la obesidad parental.....	58
9.3.1	Ganancia de peso corporal de la progenie F1 de ratas Wistar obesas (H y M)	58
9.3.2	Efecto de la obesidad parental (H y M) de ratas Wistar sobre la somatometría de la progenie F1.....	59
9.3.3	Efecto de la obesidad parental (H y M) de ratas Wistar sobre la adiposidad de la progenie F1.....	60
9.3.4	Análisis bioquímico de plasma sanguíneo en la progenie F1 de ratas Wistar obesas (H y M).....	63
9.3.5	Análisis metabólico de la progenie F1 de ratas Wistar obesas (H y M)	63
9.4	Efecto de la obesidad parental sobre el peso y la histología de las glándulas salivales mayores de la progenie F1.....	70
9.4.1	Análisis del efecto de la obesidad parental (H y M) sobre la glándula salival parótida de la progenie F1.	70
9.4.2	Análisis del efecto de la obesidad parental (H y M) sobre el paquete glandular submandibular-sublingual de la progenie F1.....	71
9.4.3	Panel comparativo de micrografías histológicas de la progenie F1 de ratas Wistar hembra obesas (H) y ratas Wistar hembra con normopeso (h)	74
9.4.3	Panel comparativo de micrografías histológicas de la progenie F1 de ratas Wistar macho obesos (M) y ratas Wistar macho con normopeso (m);Error! Marcador no definido.	
X	DISCUSIÓN.....	78
XI	CONCLUSIONES	93
XII	REFERENCIAS	96

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURA 1: Comparación entre datos de 2012 y 2018 del porcentaje de población de 20 años y más de edad con sobrepeso y obesidad, de acuerdo a su sexo.

FIGURA 2: Comparación entre datos de 2012 y 2018 del porcentaje de población de 19 años o menos de edad con sobrepeso y obesidad, de acuerdo a su sexo.

FIGURA 3: Anatomía comparada de la localización de las glándulas salivales mayores (parótida, submandibular y sublingual) en rata y humano.

FIGURA 4: Histología acinar de las glándulas salivales mayores.

FIGURA 5: Metodología utilizada en el programa FIJI/ImageJ para la cuantificación de acinos en las glándulas parótidas de rata Wistar.

FIGURA 6: Ganancia porcentual de peso corporal e ingesta calórica de la generación F0 de ratas Wistar hembra y macho.

FIGURA 7: Adiposidad de ratas Wistar hembra y macho de la generación F0.

FIGURA 8: Prueba metabólica de tolerancia a la glucosa en ratas Wistar machos y hembras F0.

FIGURA 9: Prueba metabólica de sensibilidad a la insulina en ratas Wistar machos y hembras F0.

FIGURA 10: Evaluación de la glándula salival parótida de ratas Wistar machos y hembras F0.

FIGURA 11: Evaluación del paquete glandular submandibular-sublingual de ratas Wistar machos y hembras F0.

FIGURA 12: Ganancia de peso corporal en la progenie F1 de ratas Wistar obesas H y M.

FIGURA 13: Efecto de la obesidad parental (H y M) de ratas Wistar sobre la adiposidad de la progenie F1

FIGURA 14: Efecto de la obesidad materna (H) de ratas Wistar sobre la tolerancia a la glucosa de la progenie F1

FIGURA 15: Efecto de la obesidad paterna (M) de ratas Wistar sobre la tolerancia a la glucosa de la progenie F1.

FIGURA 16: Efecto de la obesidad materna (H) de ratas Wistar sobre la sensibilidad a la insulina de la progenie F1.

FIGURA 17: Efecto de la obesidad paterna (M) de ratas Wistar sobre la sensibilidad a la insulina de la progenie F1.

FIGURA 18: Efecto de la obesidad parental sobre la glándula salival parótida de la progenie F1 de ratas Wistar.

FIGURA 19: Efecto de la obesidad parental sobre el paquete de glándulas submandibular-sublingual de la progenie F1 de ratas Wistar.

TABLA 1: Composición de macronutrientes y aporte calórico de las dietas.

TABLA 2: Grupos de trabajo de la generación F0.

TABLA 3: Grupos de trabajo de la generación F1

TABLA 4: Somatometría de ratas Wistar hembra y macho generación F0

TABLA 5: Análisis de marcadores bioquímicos de ratas Wistar hembra y macho generación F0

TABLA 6: Efecto intergeneracional de la obesidad materna (H) sobre las crías hembra y macho F1

TABLA 7: Efecto intergeneracional de la obesidad paterna (M) sobre las crías hembra y macho F1

TABLA 8: Efecto de la obesidad materna (H) de ratas Wistar en los indicadores bioquímicos del plasma sanguíneo de la progenie F1

TABLA 9: Efecto de la obesidad paterna (M) de ratas Wistar en los indicadores bioquímicos del plasma sanguíneo de la progenie F1

Panel 1. Micrografías de las glándulas salivales mayores de ratas Wistar hembras F0 (h y H)

Panel 2. Micrografías de las glándulas salivales mayores de ratas Wistar machos F0 (m y M)

Panel 3. Micrografías de las glándulas salivales mayores de la progenie F1 ratas Wistar hembras F0 (h y H).

Panel 4. Micrografías de las glándulas salivales mayores de la progenie F1 ratas Wistar machos F0 (m y M).

ABREVIATURAS

DOHaD: Orígenes del Desarrollo de la Salud y Enfermedad

GP: Glándula salival parótida

GSL: Glándula salival sublingual

GSM: Glándula saliva submandibular

HFD: Dieta alta en grasas

IMC: Índice de masa corporal

IP: Intraperitoneal

NFD: Dieta estándar

PAS: Ácido periódico de Schiff

ROI: Área de interés

TA: Adiposidad total

TARP: Tejido adiposo retroperitoneal

TASC: Tejido adiposo subcutáneo

TASG: Tejido adiposo supragenadal

TAV: Tejido adiposo visceral

ZT: Hora en la que se enciende la luz en el bioterio

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la obesidad se define como una acumulación anormal o excesiva de grasa corporal que promueve un desajuste tanto en el funcionamiento del tejido adiposo como del metabolismo. Igualmente, los antecedentes indican que la obesidad puede estar relacionada con el desarrollo de algunas enfermedades bucales debido a modificaciones en la estructura histológica de las glándulas salivales mayores. Anteriormente se han llevado a cabo esfuerzos de investigación básica para dilucidar los mecanismos de esta relación. Sin embargo, se ha encontrado que las investigaciones previas, generalmente, se han enfocado en analizar al sexo masculino y en investigar una o dos de las tres glándulas salivales mayores. Además, ninguna de estas investigaciones ha tenido un enfoque hipótesis de los orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad (DOHaD) que determine si la obesidad paterna o materna pueda o no tener efecto sobre el desarrollo temprano de las glándulas salivales mayores predisponiendo al individuo a desarrollar alguna enfermedad oral en algún momento de su vida post-natal.

En el presente trabajo se estandarizó un modelo de obesidad en ratas Wistar hembras y machos mediante la aplicación de un paradigma alimentario de 18 semanas; utilizando una dieta alta en grasas con un 59.5% de aporte calórico proveniente de lípidos. Esta estrategia metodológica generó hembras obesas que se caracterizaron por presentar una ganancia del 24% en el peso corporal, un aumento del 2.5% de tejido adiposo total, hiperglucemia, intolerancia a la glucosa e hiperleptinemia. Igualmente, generó machos obesos caracterizados por presentar una ganancia del 55% en el peso corporal, un aumento del 3.6% de tejido adiposo total, hiperglucemia, intolerancia a la glucosa, hipercolesterolemia e hiperleptinemia. Asimismo, se observó que la obesidad en hembras desencadenó una atrofia del 25% en las glándulas salivales parótidas y una disminución del 23.7% en los acinos mucosos presentes en las glándulas salivales submandibulares. Por otra parte, la obesidad en machos, generó un aumento del 30% en el número de acinos serosos de las glándulas salivales parótidas.

Al mismo tiempo, el análisis del efecto intergeneracional de la obesidad parental, indicó que la obesidad materna promueve: un aumento del 9% en el IMC, hiperglucemia e intolerancia a la glucosa en machos, sin tener un efecto sobre el desarrollo temprano de las glándulas salivales mayores. Mientras que la obesidad paterna desencadenó una pérdida de peso corporal del 12% en hembras y del 14% en machos, así como intolerancia a la glucosa en estos últimos. Asimismo, la obesidad paterna produjo un aumento en el peso de las glándulas parótidas y en el número de acinos serosos de estas glándulas, tanto en hembras como en machos, por lo tanto, solo el efecto de la obesidad paterna se ve reflejado en la histología de la glándula salival parótida.

Finalmente, los resultados generados en este trabajo se sirven de antecedente para acumular evidencias en ciencia básica que puedan aportar al entendimiento de los procesos patológicos asociados a la obesidad en los problemas clínicos de la salud oral y, por lo tanto, llevar al desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas al restablecimiento del funcionamiento óptimo de las glándulas salivales en individuos con sobrepeso y/u obesidad.

II ABSTRACT

According to the World Health Organization (WHO), obesity is defined as an abnormal or excessive accumulation of body fat that promotes an imbalance in both adipose tissue function and metabolism. Likewise, history indicates that obesity may be related to the development of some oral diseases due to modifications in the histological structure of the major salivary glands. Basic research efforts have previously been undertaken to elucidate the mechanisms of this relationship. However, it has been found that previous research has generally focused on analyzing males and investigating one or two of the three major salivary glands. Furthermore, none of these investigations have had a DOHaD approach to determine whether or not paternal or maternal obesity may have an effect on the early development of the major salivary glands predisposing the individual to develop oral disease at some point in postnatal life.

In the present work, an obesity model was standardized in female and male Wistar rats by applying an 18-week feeding paradigm; using a high-fat diet with 59.5% of caloric intake coming from lipids. This methodological strategy generated obese females characterized by a 24% gain in body weight, a 2.5% increase in total adipose tissue, hyperglycemia, glucose intolerance and hyperleptinemia. It also produced obese males characterized by a 55% gain in body weight; a 3.6% increase in total adipose tissue; hyperglycemia, glucose intolerance, hypercholesterolemia, and hyperleptinemia.

Likewise, it was observed that obesity in females triggered a 25% atrophy in the parotid salivary glands and a 23.7% decrease in the mucous acini present in the submandibular salivary glands. On the other hand, obesity in males generated a 30% increase in the number of serous acini in the parotid salivary glands.

At the same time, the analysis of the intergenerational effect of parental obesity indicated that maternal obesity promotes: a 9% increase in BMI, hyperglycemia, and glucose intolerance in males, without having an effect on the early development of the major salivary glands. Additionally, paternal obesity triggered a 12% body weight loss in females and 14% in males, as well as glucose intolerance in the latter. Also, paternal obesity produced an increase in both the weight of the parotid glands and in the number of serous acini of these glands, in both females and males.

Finally, the results generated in this work serve as a background to accumulate evidence in basic science that can contribute to the understanding of the pathological processes associated with obesity in clinical oral health problems and, therefore, lead to the development of therapeutic strategies aimed at restoring the optimal functioning of the salivary glands in overweight and/or obese individuals.

3.1 Obesidad

La obesidad, se ha convertido en uno de los principales problemas de salud a nivel mundial. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) la obesidad se define como una acumulación anormal o excesiva de grasa, es una enfermedad sistémica, crónica y multifactorial que involucra a todos los grupos de edad, etnias y clases sociales. La herramienta usada para diagnosticar esta condición es el índice de masa corporal (IMC), un indicador de la relación entre el peso y la talla, se calcula dividiendo el peso de una persona en kilos por el cuadrado de su talla en metros (kg/m^2). La OMS ha categorizado el nivel de peso de una persona de acuerdo a diferentes rangos del IMC, se estima que un IMC por debajo de 18.5 indica bajo peso, el rango de 18.5-24.9 indica un nivel de peso normal, el sobrepeso se encuentra en el rango de 25-29.9 y la obesidad en rangos de 30 o más, subclasificada de la siguiente manera: obesidad grado I (30 a 34.9), obesidad grado II (35 a 39.9) y obesidad grado III (40 o más) (OMS, 2021; Huang, Yan, Chen, & Liu, 2016).

3.1.1 Epidemiología de la obesidad

En México, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2018 (ENSANUT, 2018), reportó una prevalencia de sobrepeso y obesidad de 75.2% (39.1% sobrepeso y 36.1% obesidad) en población mayor de 20 años y del 38.4% (23.8% sobrepeso y 14.6% obesidad) en población menor a 19 años. En comparación con la última encuesta en 2012, tanto hombres como mujeres se han sumado en el desarrollo de estas enfermedades, siendo las mujeres el grupo de la población más afectado (fig.1 y fig.2). Una de las principales características en los individuos con sobrepeso y obesidad es el aumento en el volumen de tejido adiposo. El aumento excesivo de peso corporal es un proceso gradual a partir de un desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético; en su origen se involucran factores genéticos y ambientales que determinan un trastorno metabólico que conduce a una excesiva acumulación de tejido adiposo, sobrepasando los estándares establecidos de peso corporal según el género, la talla y la edad (Huang, Yan, Chen, & Liu, 2016).

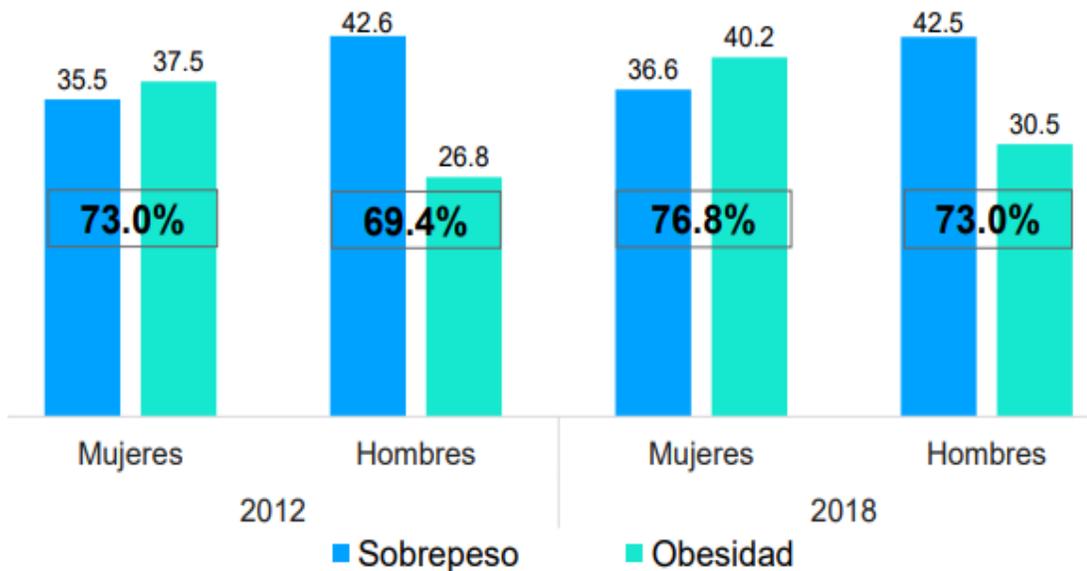


Figura 1. Comparación entre datos de 2012 y 2018 del porcentaje de población de 20 años y más de edad con sobrepeso y obesidad, de acuerdo a su sexo. Tomada de ENSANUT, 2018.

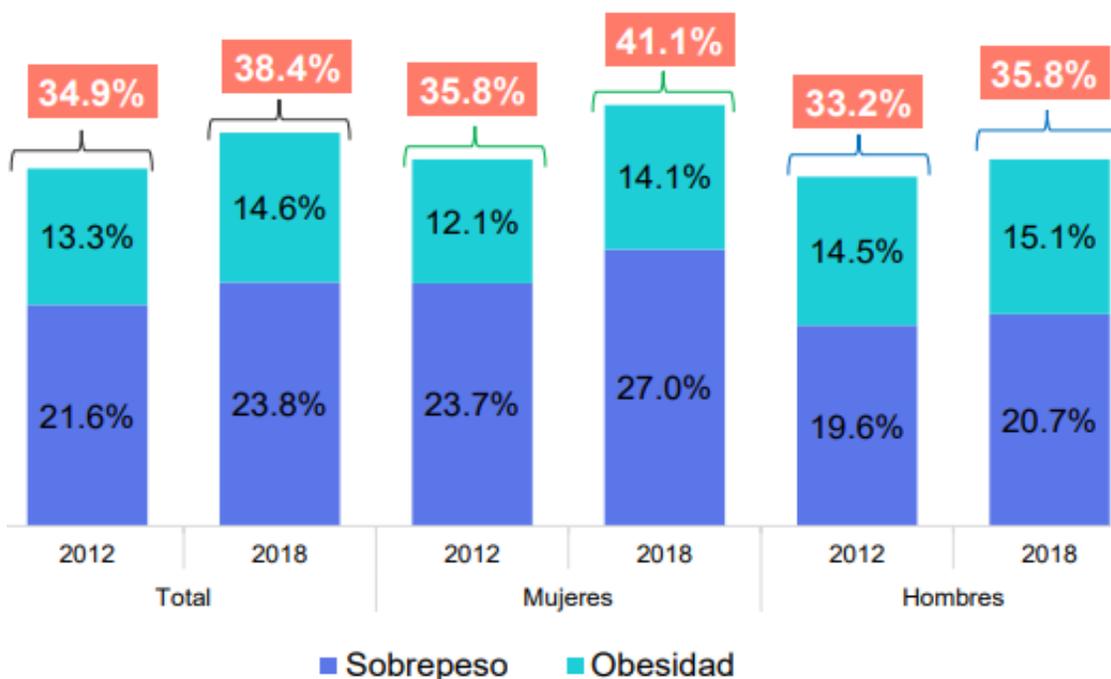


Figura 2. Comparación entre datos de 2012 y 2018 del porcentaje de población de 19 años o menos de edad con sobrepeso y obesidad, de acuerdo a su sexo. Tomada de ENSANUT, 2018.

3.1.2 Repercusiones en la salud

Asimismo, el sobrepeso y la obesidad son condiciones clínicas que aumentan el riesgo de padecer enfermedades no transmisibles. En diferentes estudios se ha reportado que la condición de obesidad está relacionada al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 (Storino & Contreras, 2012), desarrollo de hígado graso no alcohólico (Bellentani et al., 2000), enfermedades cardiovasculares, endocrinas y pulmonares (Ajani et al., 2004), algunos tipos de cáncer (Iyengar et al., 2016), trastornos en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada (Chavarro et al., 2012 & Sermondade et al., 2013), y desarrollo de patologías bucales como enfermedad periodontal y caries (Buduneli et al., 2014). Aunado a los problemas de salud que se asocian con la obesidad, el estudio, diagnóstico y tratamiento de la obesidad suelen complicarse, debido a que esta patología tiene una naturaleza multifactorial que resulta de una combinación de factores genéticos, fisiológicos, conductuales, sociales y ambientales (Unamuno, et al., 2018). La obesidad no sólo tiene repercusiones en la persona que la padece, sino también a nivel social, tanto que esta patología se reconoce actualmente como uno de los retos más importantes de la Salud Pública a nivel mundial. Recientemente se han sumado esfuerzos para dilucidar los mecanismos que subyacen en la obesidad y la relación que existe entre ésta y las alteraciones funcionales en la cavidad oral, ya que son las menos estudiadas. Hasta ahora se han observado cambios en la microbiota oral derivados de la condición obesa, mismos que se ha planteado puedan ser un derivado de alteraciones funcionales en las glándulas salivales (Roa & Del Sol, 2018). Por otro lado, también se ha comenzado a estudiar la obesidad desde un enfoque epigenético, dichos estudios han permitido evaluar el papel de este tipo de mecanismos en el origen y desarrollo de la obesidad (Casanello, Krause, Castro, & Uauy, 2016).

3.1.3 Repercusiones en la economía

El aumento en el número de personas con un alto índice de masa corporal, está colapsando los presupuestos de salud (Secretaría de Economía, 2020), debido al alto costo de las enfermedades crónicas asociadas al sobrepeso y la obesidad. La emergencia nacional decretada en México en 2016, ahora se ha convertido en una emergencia económica. En enero del 2020, durante el seminario “Sobrepeso, Obesidad y Diabetes: efectos sobre la competitividad del país” realizado por la secretaría de economía y la secretaría de salud, se dieron a conocer los resultados de los estudios de prospección de la OCDE, los cuales sugieren que entre el 2020 y el 2050, el país podría perder 5.3 % del PIB anual como consecuencia de la epidemia de obesidad, lo que representa una cifra dramática, ya que el 5.3% del

PIB equivalen actualmente en pesos a 1.3 billones de pesos, una cifra superior al presupuesto asignado a todos los ramos de la administración en el Presupuesto de Egresos de la Federación 2020; esa cifra es superior al presupuesto total establecido conjuntamente para el ISSSTE y el IMSS (OCDE, 2019 & Secretaría de Economía, 2020).

3.2 Tejido adiposo

Debido a que la obesidad se define en función del aumento del tejido adiposo, es necesario conocer sus funciones para entender la patología. El tejido adiposo es un órgano con funciones neuroinmunoendocrinas, es decir que, tiene la capacidad de ejercer efectos en otros tejidos gracias a la secreción de moléculas llamadas adipocinas, que a su vez pueden tener efectos inflamatorios y participa en la homeostasis del organismo (Frigolet & Gutiérrez, 2020). Posee una gran plasticidad y variabilidad funcional que se adapta a la ingesta de nutrientes y al incremento o disminución de su volumen, el cual modifica la función y el número de células que lo integran (Vega & Rico, 2019). Hasta ahora se ha descrito que existen diferentes tipos de tejido adiposo, los cuales se pueden clasificar de acuerdo a sus características histológicas en tejido adiposo blanco, pardo y beige, o de acuerdo a su localización anatómica, se divide en tejido adiposo subcutáneo y tejido adiposo visceral (Mohsen, 2010 & Cypess, 2022).

3.2.1 Estructura y función fisiológica

El tejido adiposo es un tipo de tejido conjuntivo especializado, cuyos componentes celulares principales llamados adipocitos se mantienen unidos mediante fibras reticulares de colágena tipo III (Frigolet & Gutiérrez, 2020). Además, el tejido adiposo alberga otras células como fibroblastos, células endoteliales y macrófagos (Cypess, 2022). Como se mencionó anteriormente, este tejido se puede clasificar en tejido adiposo blanco, pardo o beige dependiendo del tipo de adipocitos que lo forman; así el tejido adiposo blanco está formado principalmente por adipocitos uniloculares; el tejido adiposo pardo presenta principalmente adipocitos multiloculares que por sus características celulares tiene funciones termogénicas importantes y el tejido adiposo beige está conformado por adipocitos similares a los encontrados en el tejidos adiposo pardo, pero estos se acumulan cerca e incluso mezclados con el tejido adiposo blanco (Vega & Rico, 2019). El tejido adiposo blanco es el más abundante, el principal depósito de almacenamiento de grasa en forma de triacilgliceroles y también funciona como el órgano endocrino más grande

del cuerpo, secretando adipocinas y citocinas a nivel sistémico (Unamuno et al, 2018). Las adipocinas están involucradas en varias cascadas de señalización metabólica y fisiológica que regulan la señalización de la insulina, la captación de glucosa, la oxidación de ácidos grasos y otros procesos metabólicos y de producción de energía. Las citocinas regulan la inflamación junto con la angiogénesis adaptativa y reparadora (Tatsua, Michael, & Rosario, 2021) De acuerdo a su localización anatómica se identifican: el tejido adiposo subcutáneo (TASC), que se encuentra, como su nombre lo dice, debajo de la piel de todo el cuerpo y el tejido adiposo visceral (TAV), que se localiza principalmente en el mesenterio y epiplón (Frigolet & Gutiérrez, 2020). Existen diferencias anatómicas, celulares, moleculares y fisiológicas entre estos tipos de tejido. Las principales son las siguientes: el TAV contiene más densidad celular y vascular, es decir se encuentra más inervado y contiene una mayor cantidad de componentes celulares inflamatorios e inmunes, los adipocitos que lo componen son uniloculares, pero de mayor tamaño que los adipocitos del TASC, y metabólicamente más activos, debido a que son más sensibles a la lipólisis y más resistentes a la insulina, tienen una mayor capacidad para generar ácidos grasos libres y captar glucosa. Por su parte el TASC, es más sensible en la absorción de ácidos grasos libres y triacilglicerol circundantes (Mohsen, 2010).

3.2.2 Alteraciones estructurales y metabólicas en la obesidad

El tejido adiposo juega un papel fundamental en el desarrollo de la obesidad, ya que al existir un balance energético positivo, el tejido adiposo de sujetos obesos sufre diferentes procesos de remodelación celular y estructural para adaptar la ingesta calórica excesiva incluyendo: la expansión del tejido a través de hiperplasia (aumento del número de células) e hipertrofia (aumento del tamaño de las células) (Qiong et al., 2013), infiltración de células inmunes en el tejido adiposo y de la remodelación de la matriz extracelular para permitir la expansión adecuada del tejido (Ferrante, 2013 & Weisberg et al., 2003). Estas adaptaciones del tejido adiposo dan lugar al desarrollo del síndrome metabólico, ya que los adipocitos son células metabólicamente activas y secretan un gran número de adipocinas, principalmente leptina, involucradas en la regulación del apetito, funciones inflamatorias, inmunitarias, regulan la homeostasis de la glucosa, el metabolismo de los lípidos, la homeostasis cardiovascular y la reproducción, entre otras importantes funciones biológicas y fisiológicas (Unamuno et al., 2018). Los elementos liberados anormalmente por estas células, ocasionan hiperleptinemia, inflamación local y sistémica, predominantemente cuando provienen del tejido adiposo visceral y pueden afectar diversos órganos. Asimismo, diversos reportes apuntan a que la

obesidad implica un mayor riesgo para el paciente de padecer enfermedades inflamatorias, metabólicas, autoinmunes, alérgicas, alteraciones en la cicatrización, patologías orales y cáncer (Vega et al., 2021 & Tatsua, Michael, & Rosario, 2021).

3.3 Programación metabólica

En las últimas décadas, se ha demostrado que el desequilibrio de nutrientes en los primeros años de vida, desde la concepción hasta la infancia, influye en el riesgo de desarrollar obesidad posterior al nacimiento, lo que sugiere que la obesidad podría ser el resultado de una "programación durante el desarrollo" (Marouze, Lesage, & Eberlé, 2019). Dentro de la gran tarea científica en la investigación de la etiología de la obesidad, se ha propuesto la hipótesis de los orígenes tempranos de la salud y la enfermedad (DOHaD), donde se menciona que la exposición a diversas condiciones ambientales en etapas tempranas de la vida intra y extrauterina pudieran inducir a cambios en el epigenoma gracias a la plasticidad del desarrollo, las cuales podrían estar relacionadas con el origen y desarrollo de la obesidad (Baker, 2007). A este concepto se le ha denominado programación metabólica (Strakovsky et al., 2015). Estudios recientes han permitido evaluar que los cambios epigenéticos en la vida temprana a causa de una mala nutrición, pueden permanecer en estado latente hasta que su influencia biológica se active más adelante en el curso de la vida (Casanello, Krause, Castro, & Uauy, 2016)

3.3.1 Mecanismos de herencia epigenética

Las enfermedades genéticas tradicionales ligadas a mutaciones o corrimientos en el marco de lectura en el ADN, modifican la secuencia de las bases nitrogenadas de manera permanente. Los cambios epigenéticos, por el contrario, son potencialmente reversibles y se refieren a modificaciones en las histonas (proteínas del nucleosoma asociadas al ADN) y en el ADN mismo, sin cambiar la secuencia de nucleótidos (Casanello, Krause, Castro, & Uauy, 2016). Las marcas epigenéticas son potencialmente hereditarias a través del proceso mitótico. Sin embargo, actualmente existen diversos estudios para esclarecer si estas modificaciones pueden traspasarse de una generación a otra y mediante qué mecanismos. Las principales marcas epigenéticas son: la metilación del ADN que se produce en las citosinas adyacentes las guaninas (sitios «CpG»), la acetilación y/o metilación de las histonas, así como la interferencia de la traducción mediante microARN o ARN mensajero (mARN). El epigenoma tiene el potencial de ser modificado por la exposición a una serie de factores nutricionales y/o ambientales permitiendo la

adaptación en un menor tiempo y responder a cambios ambientales de forma más dinámica. Investigaciones recientes han establecido una relación entre las modificaciones epigenéticas en las histonas y el desarrollo de la obesidad o una mayor susceptibilidad a desarrollarla (Samuelsson et al., 2008 & Chen et al., 2008). Los estudios epidemiológicos más recientes han demostrado que la exposición a un ambiente nutricional subóptimo durante el desarrollo, como resultado de una ingesta de energía materna excesiva se asocia con un mayor riesgo de obesidad y otras enfermedades crónicas relacionadas con ella (O'Reilly & Reynolds, 2013, Wilson & Messaoudi, 2015 & Rodríguez et al., 2019).

3.3.2 Intergeneracionalidad y transgeneracionalidad

Las investigaciones de los efectos a largo plazo, es decir, a través de varias generaciones (F1 o F2), han contribuido a reforzar la hipótesis sobre los orígenes tempranos de la salud y la enfermedad (DOHaD), concepto que surgió tiempo después de la programación fetal (Strakovsky et al., 2015), sugiriendo que el riesgo de desarrollar o ser propenso a ciertas enfermedades, como la obesidad, podría estar parcialmente programado por el ambiente perinatal que afecta no solo al feto (efecto intergeneracional), sino que en el caso de un feto de sexo femenino puede tener efectos transgeneracionales al marcar a los ovocitos del ovario de la futura prole en la segunda generación. Esta hipótesis sugiere que las exposiciones ambientales transitorias experimentadas en la vida temprana, pueden tener efectos permanentes, los cuales se manifestarían en etapas posteriores de la vida intrauterina, provocando así un aumento en el riesgo de padecer enfermedades crónicas. Los mecanismos precisos que establecen esta memoria en la respuesta metabólica aún no están absolutamente claros, pero es probable que incluyan cambios en las trayectorias de maduración y desarrollo de los tejidos; en la reprogramación de células troncales, en la estructura de los tejidos, en el funcionamiento del sistema endocrino y en la regulación metabólica relacionada con el crecimiento y la maduración sexual (Hanson & Gluckman, 2014; Casanello, Krause, Castro, & Uauy, 2016; Barrès & Zierath, 2016). Los hallazgos más relevantes, que hasta ahora apoyan el rol de la epigenética en la programación fetal y su impacto en el desarrollo de enfermedades en la etapa adulta, se han llevado a cabo principalmente en modelos animales, los cuales han permitido evidenciar el impacto del entorno nutricional intrauterino en el epigenoma y el fenotipo de la descendencia.

3.4 Modelos de obesidad

Los modelos animales han contribuido de manera fundamental a la comprensión de los procesos básicos que regulan nuestro equilibrio energético y con ello la obesidad. Uno de los modelos animales más utilizados en investigación son los roedores (ratas, ratones, conejos), debido a su fácil manejo y mantenimiento. Asimismo, con el surgimiento del enfoque DOHaD para estudiar el origen temprano de la obesidad y de las enfermedades relacionadas a esta condición, se han utilizado principalmente cuatro tipos diferentes de modelos animales en el estudio de las bases biológicas, fisiológicas y genéticas de la obesidad (Speakman, Hambly, Mitchell, & Elbieta, 2008):

1. Modelos animales que poseen mutaciones monogénicas que han aparecido de forma espontánea en colonias de roedores en laboratorio.
2. Modelos animales en los que se han inducido mutaciones que promueven un fenotipo de obesidad.
3. Modelos animales con alteraciones en la expresión génica ligada a la obesidad en tejidos específicos y ventanas de tiempo determinadas
4. Modelos animales con exposición a dietas obesogénicas hipercalóricas (altas en grasas, altas en azúcares o mixtas)

En el desarrollo de las estrategias antes mencionadas, la cepa de ratas Wistar ha sido ampliamente utilizada dentro del grupo de modelos animales en los que se utilizan dietas modificadas para inducir una condición de obesidad. Siendo además una de las cepas de pequeños mamíferos más utilizada debido a la similitud y homología entre su genoma y el de los humanos (Lacroix, Gaudichon, & Martin, 2004; Von Diemen, Neubarth, & Manoel, 2006).

3.5 Relación de la obesidad con patologías bucales

Diversos estudios muestran que el incremento en la prevalencia de la obesidad se correlaciona con el aumento de las enfermedades bucales entre ellas las patologías periodontales, la xerostomía y se ha observado una mayor incidencia de caries dentales, dado que el balance entre la pérdida de minerales y la reparación y mineralización de los dientes está relacionada con la cantidad y calidad de la saliva, siendo así, los cambios en la saliva podrían promover el desarrollo de caries, que serían el inicio del desarrollo de la enfermedad periodontal (Roa & Del Sol, 2018).

Asimismo, recientemente se ha confirmado que el aumento en la actividad del tejido adiposo influye en el desarrollo y/o la gravedad de estas enfermedades. Se ha reportado incluso que el aumento de 1.0 kg en el peso corporal puede aumentar en un 6% el riesgo de enfermedad periodontal en adolescentes (Salamonowicz, Zalewska, & Maciejczyk, 2019; Modéer, Blomberg, Wondimu, Julihn, & Marcus, 2010). Las enfermedades bucales en su mayoría son irreversibles y su efecto se acumula a lo largo de la vida, de tal forma que los daños tienden a ser mayores en la población adulta. Las enfermedades bucales más comunes son la gingivitis, la periodontitis y más frecuentemente la caries. De acuerdo con los resultados del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, se reporta que, en usuarios del servicio de salud pública en nuestro país, la prevalencia de caries dental en niños y adolescentes de entre 2 y 19 años de edad es del 75% y del 93.2% en la población adulta. En cuanto a las enfermedades periodontales, la prevalencia en niños y adolescentes, de 2 a 19 años, es del 11.3%, mientras que para la población adulta es del 56.8% (SIVEPAB, 2015). Considerando lo anterior y dada la asociación que existe entre la obesidad y las enfermedades bucales, el tratamiento de estos pacientes se ha vuelto una importante carga social y económica para los sistemas de salud pública y privada en la atención de estas patologías.

3.6 Glándulas salivales

Las glándulas salivales son órganos que se originan a partir del ectodermo. Se clasifican en principales o mayores, cuando son responsables de la producción del 92 al 95% de la saliva y, accesorias o menores, cuando son responsables de la producción del 5 al 8% de la saliva. La saliva es una secreción líquida de viscosidad variable, compuesta por agua, iones como sodio, potasio y cloro, diferentes enzimas, dentro de las cuales la más abundante es α -amilasa; también contiene mucina, una variedad de proteínas plasmáticas, leucocitos e inmunoglobulinas que ayudan a mantener la humedad en la mucosa bucal y la homeostasis en la cavidad oral (Sánchez, 2013).

3.6.1 Estructura histológica de las glándulas salivales mayores

El objetivo de nuestro proyecto se enfocó en las glándulas salivales mayores, que tanto en humanos como en roedores constan de tres pares de glándulas macroscópicas: parótida, submandibular y sublingual (Fig.3). Estas glándulas son estimuladas por el sistema nervioso somático, que promueven la secreción de saliva hacia la cavidad oral (Amano, Mizobe, Bando, & Sakiyama, 2012).

Los elementos de la saliva son secretados en estructuras de las glándulas salivales llamadas acinos (Fig.4). Un acino se compone de varias células secretoras y células mioepiteliales circundantes. En las glándulas salivales de humanos y roedores los principales tipos de las células secretoras que conforman los acinos son serosas (Fig.4B) y mucosas (Fig.4A). (Dintzis & Treuting, 2018). Las secreciones serosas se conocen como saliva de dilución, ésta saliva es líquida, de textura albuminosa, desprovista de moco, y está conformada principalmente por agua, iones y proteínas como la α -amilasa. Los gránulos secretores mucosos contienen grandes cantidades de mucina y glicoproteínas, esta secreción es llamada saliva de deslizamiento y tiene una textura viscosa. También existen los acinos mixtos (Fig. 4C), que se encuentran en forma abundante en la glándula submandibular, contienen células serosas y mucosas, en estas estructuras los extremos distales de los acinos mucosos, están rodeados por semilunas serosas (Sánchez, 2013; Fortoul, 2017).

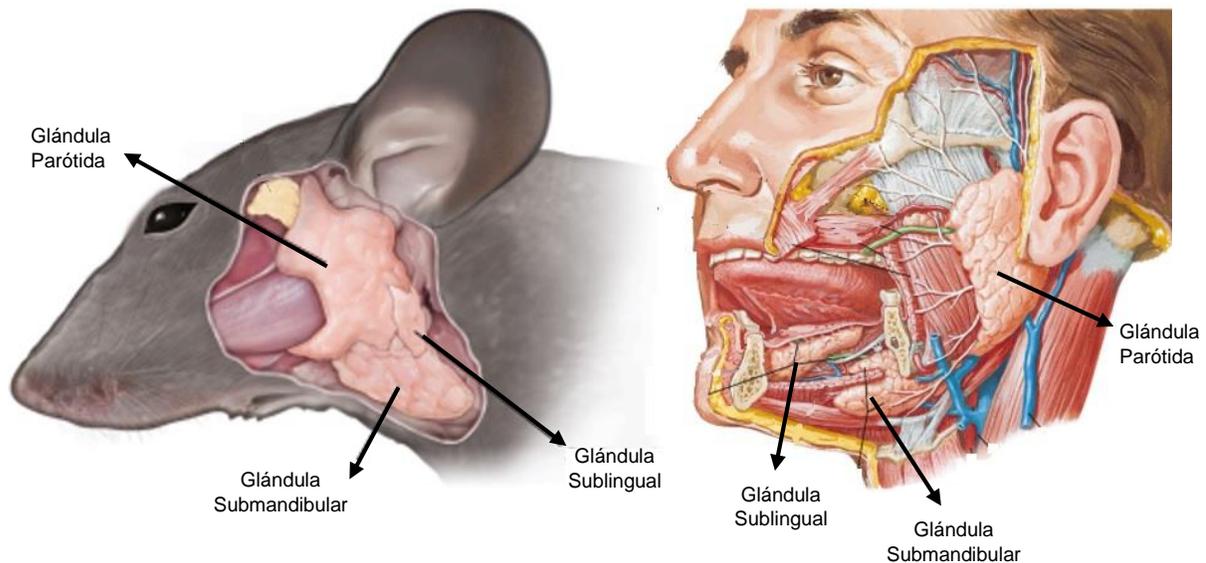


Figura 3. Anatomía comparada de la localización de las glándulas salivales mayores (parótida, submandibular y sublingual) en rata y humano. Imagen modificada de (Dintzis & Treuting, 2018)

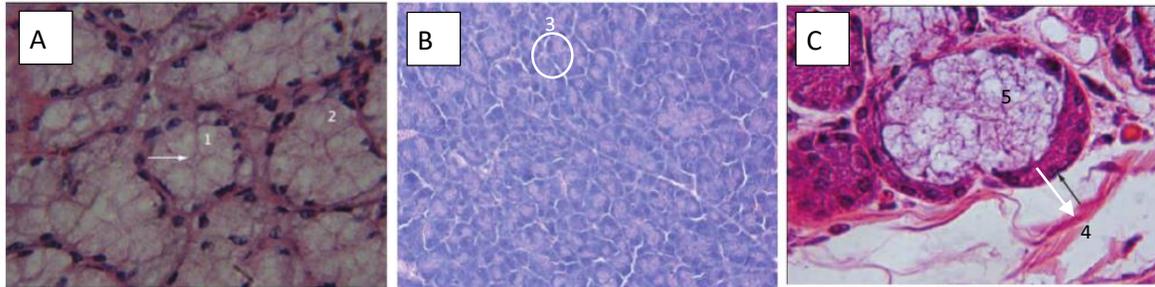


Figura 4. Histología acinar de las glándulas salivales mayores. A. Acinos mucosos: 1. Núcleo celular, 2. Citoplasma. B. Acinos serosos: 3. Conjunto de células secretoras. C. Acino mixto: 4. Células serosas y 5. Células mucosas. Imágenes modificadas de (Fortoul, 2017)

3.6.1.1 Glándula parótida

Las glándulas parótidas, son las de mayor tamaño en humanos, se localizan dentro del triángulo rodeado en la parte superior por el arco cigomático, anteriormente por el masetero y posteriormente por el esternocleidomastoideo. El conducto parotídeo (Stensen o Stenon) desemboca del borde anterior y se abre en la cavidad bucal. En roedores, la glándula parótida se encuentra detrás y debajo de la oreja, bordeando caudalmente a la glándula submandibular, esta glándula es multilobulada y difusa (Dintzis & Treuting, 2018). Tanto las glándulas parótidas humanas como las de roedores están compuestas de acinos serosos únicamente. Estas células tienen un retículo endoplásmico rugoso bien desarrollado en la región infra nuclear y están rodeadas de células mioepiteliales (Amano, Mizobe, Bando, & Sakiyama, 2012).

3.6.1.2 Glándula submandibular

Las glándulas submandibulares de roedores se encuentran formando un paquete compacto con las glándulas sublinguales en los espacios anteriores del cuello, entre los ganglios linfáticos submandibulares y el esternón. En cambio, la glándula submandibular humana se encuentra separada de la sublingual. Para ambas especies la glándula carótida es mixta ya que está compuesta por células acinares tanto serosas como mucosas, la de los roedores tiene una mayor cantidad del tipo seroso. Mientras que las semilunas serosas están marcadas en los acinos mixtos de la glándula humana, esta no se presenta en la glándula de los roedores (Amano, Mizobe, Bando, & Sakiyama, 2012). En la parte apical de las células se encuentran los gránulos de secreción, los acinos mucosos presentan gránulos con abundante mucina, estos granulos a menudo se aprecian como vacuolas claras dentro del

tejido, presentan abundante retículo endoplásmico rugoso en la región peri nuclear así como numerosas mitocondrias (Botts & Leininger, 2018).

3.6.1.3 Glándula sublingual

La glándula sublingual ocupa la cuarta parte latero-rostral del complejo submandibular-sublingual en roedores. Ambas glándulas se encuentran encapsuladas en un tejido conectivo común. Las glándulas sublinguales de humanos son glándulas mixtas, en su mayoría mucosas y en roedores tienden a ser exclusivamente mucosas (Amano, Mizobe, Bando, & Sakiyama, 2012). Las células de los acinos mucosos presentan una forma piramidal con abundante citoplasma, con vacuolas de gran tamaño que generalmente se observan como zonas claras abarcando la mayoría del citoplasma celular, el núcleo se encuentra alargado y en posición basal (Dintzis & Treuting, 2018). Por lo tanto, aunque en los roedores las glándulas sublinguales y submandibulares estén anatómicamente ligadas, son fáciles de distinguir unas de otras al microscopio óptico.

3.6.2 Función fisiológica

Las glándulas salivales están inervadas por nervios simpáticos y parasimpáticos, estas inervaciones permiten una secreción constitutiva de saliva en cualquier condición fisiológica. Las glándulas salivales generan un volumen de saliva adecuado que facilita la preparación, masticación y deglución de los alimentos para formar el bolo alimenticio e iniciar la digestión al degradar el almidón gracias a la presencia de la enzima α -amilasa, también favorece el balance hidromineral del ingreso de agua y la sensación gustativa. Asimismo, contribuye a la higiene de los tejidos blandos y los dientes, gracias a que la saliva ejerce un efecto de arrastre y limpieza de la mucosa oral y tiene un efecto antimicrobiano debido a la acción inmunológica de péptidos antibacterianos, lisozimas e inmunoglobulinas que la componen (Roa & Del Sol, 2018). Cuando estas glándulas son estimuladas de forma individual secretan sustancias serosas, mucosas o mixtas, dependiendo del tipo celular del que estén conformadas. Sin embargo, actúan como un conjunto cuando estas secreciones a través de los conductos excretores principales, conectan los cuerpos glandulares con la cavidad bucal, creando así una coordinación que satisface las necesidades orales, alterando la tasa de flujo como la composición de la saliva dependiendo de la estimulación de nervios autónomos y la masticación (Amano, Mizobe, Bando, & Sakiyama, 2012).

3.6.3 Alteraciones de las glándulas salivales asociadas a la obesidad

Una de las principales estructuras afectadas por la obesidad y sus comorbilidades son las glándulas salivales, órganos responsables de la secreción de una serie de enzimas y factores de crecimiento necesarios para mantener el balance biológico de la cavidad oral. Estudios previos en modelos murinos muestran que existe un decremento en el tamaño de las glándulas salivales como resultado de una condición de hiperleptinemia presente en los pacientes obesos, en los cuales se ha registrado un aumento y una desregulación de las funciones normales del tejido adiposo (Higa et al., 2002 & Schapher et al., 2009). En concordancia con lo anterior, se ha reportado que la obesidad y la hiperleptinemia pueden inducir también cambios en la composición de la saliva debido a modificaciones morfológicas en las glándulas salivales, relacionados principalmente con la atrofia de la glándula parótida (Rodrigues et al., 2015; Modéer, Blomberg, Wondimu, Julihn, & Marcus, 2010). Asimismo, se ha observado una disminución de alfa-amilasa salival en roedores que presentan una hiperleptinemia inducida, así como en modelos de obesidad de ratas, inducidos por efecto de glutamato monosódico (Beregova, Falayeyeva, Neporada, & Gordienko, 2014). La enzima alfa-amilasa es producida principalmente por las glándulas parótida y submandibular y tiene un papel importante en el inicio de la digestión, ya que cataliza la ruptura de los enlaces α -1,4-glucosídicos y tiene un papel importante en la colonización y metabolismo de las bacterias que conducen a la formación de la placa dental (biofilm) (Lamy, Gómez, & Lorenza, 2013). Con respecto a los cambios en la composición en la saliva, se observó en el trabajo de Lamy y colaboradores en 2018 que, al analizar la ultraestructura de las glándulas salivales mayores de ratas Wistar macho que cursan con hiperleptinemia, la glándula parótida contenía gránulos electrodensos en el citoplasma de las células acinares y bajos niveles de amilasa en las muestra de saliva, esta es la evidencia más cercana de la afección funcional de las glándulas salivales relacionadas con la obesidad (Lamy et al., 2018 & Mozaffari, y otros, 2011).

También se ha descrito que la obesidad puede afectar la estructura histológica de las glándulas salivales a través de la hiperlipidemia, un desequilibrio metabólico que genera apoptosis en las células de la glándula submandibular de rata (Irie et al., 2017). Asimismo, estudios clínicos en humanos, han relacionado la obesidad con cambios en la composición y el flujo de la saliva, un estudio comparativo entre adolescentes con obesidad y normo peso, mostró que los pacientes obesos, presentan cambios en la saliva así como en el perfil de la microbiota subgingival oral, lo que su vez permitió el crecimiento de patógenos como *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. micra*, periodonto-patógenos que predisponen a las personas obesas a desarrollar enfermedad periodontal (Zeigler et al., 2012)

Por otro lado, existen estudios que mencionan que la obesidad puede promover cambios fisiológicos en la composición de la saliva o en las glándulas salivales, pero no necesariamente afecta la arquitectura de los tejidos, por ejemplo, Mozaffari y colaboradores, realizaron un estudio sobre la susceptibilidad de ratas Zucker obesas a desarrollar caries, y observaron que, si bien las glándulas submandibulares presentaban marcadores proinflamatorios, la arquitectura de estas glándulas no se vio afectada (Mozaffari et al., 2011).

El conjunto de los hallazgos de estudios previos, ha comenzado a generar información que permite plantear la posibilidad de que la obesidad tiene un efecto sobre la morfología y la función de las glándulas salivales. Sin embargo, muchos de estos estudios se han realizado únicamente en modelos animales con machos y se ha analizado únicamente en un tipo de glándula. Además, los protocolos presentados no plantean un enfoque DOHaD que pueda empezar a explicar el origen de estas afecciones bucales a nivel intergeneracional o transgeneracional.

IV JUSTIFICACIÓN

La evidencia expuesta en los antecedentes de este proyecto, apunta a que la obesidad está relacionada con el desarrollo de algunas enfermedades bucales, las cuales se expresan mediante las modificaciones morfológicas que sufren las glándulas salivales y las alteraciones de la saliva, promoviendo así un desequilibrio en las condiciones fisiológicas de la cavidad oral que altera la microbiota y la respuesta inmune a nivel de las mucosas. Es por ello que consideramos de gran importancia realizar un estudio que profundice en el análisis de las alteraciones histológicas que presentan las glándulas salivales mayores en condiciones de obesidad. De la misma manera consideramos de suma importancia, evaluar si la exposición a un ambiente obesogénico parental pudiera influir en el desarrollo posnatal de alteraciones en las glándulas salivales que puedan desencadenar el desarrollo de patologías bucales. La identificación de este conjunto de factores permitiría sentar las bases para el diseño de estrategias terapéuticas dirigidas al restablecimiento diferencial del funcionamiento óptimo de las glándulas salivales de hombres o mujeres con sobrepeso y obesidad.

V PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La obesidad podría afectar la estructura histológica de las glándulas salivales mayores (partida, sublingual y submandibular) de las ratas Wistar dependiendo del sexo?, de ser así, ¿será posible que la obesidad parental también pueda alterar la histología de las glándulas salivales de su progenie mediante un efecto intergeneracional?

VI HIPÓTESIS

1. Si la obesidad afecta las glándulas salivales mayores dependiendo del sexo, entonces podríamos encontrar diferentes modificaciones histológicas en las glándulas parótida, sublingual y submandibular de las ratas Wistar alimentadas con una dieta alta en grasa.
2. La exposición a un ambiente parental obeso, producirá modificaciones en la estructura histológica de las glándulas salivales mayores de la descendencia, debidas a un efecto intergeneracional de la obesidad materna o paterna.

VII OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

Determinar el efecto de la obesidad sobre la estructura histológica de las glándulas salivales parótida, submandibular y sublingual de ratas Wistar obesas hembra y macho, así como de su progenie.

7.2 Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto de la ingesta de una dieta alta en grasas (HFD) en ratas Wistar machos y hembras (generación F0) sobre la somatometría y el metabolismo de la glucosa, la insulina y la determinación de los niveles séricos de leptina y lípidos.
2. Analizar el efecto de la obesidad de ratas Wistar macho y hembra sobre la estructura histológica de las glándulas salivales mayores: parótida, submandibular y sublingual.
3. Determinar el efecto de la obesidad parental sobre la somatometría y el metabolismo de la glucosa y la insulina de la generación F1
4. Examinar el efecto de la obesidad parental sobre la histología de las glándulas salivales parótida, submandibular y sublingual en la generación F1.

VIII MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Modelo biológico

La cepa de ratas Wistar ha sido ampliamente utilizada dentro del grupo de modelos animales en los que se utilizan dietas obesogénicas para inducir obesidad. Asimismo, este modelo animal se ha utilizado en algunas investigaciones sobre histología y función de glándulas salivales. Siendo además una de las cepas de pequeños mamíferos más utilizada debido a la similitud y homología entre su genoma y el de los humanos (Speakman, Hambly, Mitchell, & Elbieta, 2008).

Uno de los objetivos de este estudio fue desarrollar un modelo de obesidad en ratas Wistar machos y hembras por ingesta de una dieta alta en grasas, en el laboratorio común del departamento de Embriología y Genética de la Facultad de Medicina de la UNAM. Para ello utilizamos ratas de 21 días de edad provenientes de 10 camadas diferentes, adquiridos en el bioterio del Instituto de Ciencias Fisiológicas de la UNAM.

Para el modelo de obesidad, 20 ratas Wistar macho y 20 ratas Wistar hembras fueron alojadas en el *vivarium* del departamento de Embriología y Genética de la Facultad de Medicina, en pares o tríos dentro de jaulas estándar con tubos de cartón para enriquecimiento, manteniendo una temperatura de 24°C y un ciclo de luz-oscuridad de [12/12 h] (ciclo que sólo se cambió en la semana de reproducción a 10 h oscuridad/14 h de luz). Las jaulas se limpiaron tres veces por semana, con cambios en el material de cama, agua y alimento para mantener las medidas de higiene recomendadas por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL, 2019) de la Facultad de Medicina de la UNAM. Los animales tuvieron acceso *ad libitum* al agua y al alimento durante todo el experimento.

8.1.1 Consideraciones éticas

Los procedimientos experimentales, el manejo y el cuidado de los animales se llevaron a cabo conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 que marca las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (Diario Oficial, 2001).

8.2 Estrategia nutricional

Con el objetivo de generar un modelo de obesidad en las ratas Wistar mediante una dieta alta en grasas no comercial, el equipo de investigación del laboratorio de Embriología y Genética, trabajamos en realizar la evaluación de tres dietas altas en grasas con diferentes porcentajes de lípidos y diferentes proporciones entre los lípidos saturados e insaturados. Este trabajo fue reportado en la Tesis: “Estandarización y caracterización de un modelo murino de obesidad inducida por una dieta alta en grasas para su uso en investigación básica” (Granados, 2020)

8.2.1 Estandarización de la dieta alta en grasas (HFD)

El resultado de la evaluación de tres dietas altas en grasas (HFD), nos permitió establecer una dieta con un aporte lipídico del 60% (HFD) y una relación de 1:1 entre lípidos saturados provenientes de manteca de cerdo e insaturados provenientes de aceite de oliva como nuestra dieta obesogénica. Asimismo, consideramos tener grupos control tanto para hembras como para machos, que fueron alimentados con una dieta estándar comercial (Chow 5001), debido a que esta dieta es usada comúnmente para el mantenimiento de esta cepa. La composición nutrimental de la dieta obesogénica y la dieta control se muestra en la tabla 1

Tabla 1. Composición de macronutrientes y aporte calórico de las dietas: Estándar (Chow 5001) y Obesogénica (HFD)

Densidad energética %Kcal/g	Dieta estándar (Chow 5001)	Dieta obesogénica (HFD)
Carbohidratos	57.9 %	20.20 %
Proteínas	28.7 %	20.30 %
Grasas	13.4 %	59.5 %
Aporte calórico por gramo	4.09 Kcal/g	5.82 Kcal/g

8.2.2 Aplicación del paradigma alimentario

Para aplicar el paradigma alimentario, a las 3 semanas posnatales (SPN) separamos a las ratas hembra y macho de manera aleatoria en dos grupos obesos (H y M) y dos controles (h y m) respectivamente. Una vez asignados en los grupos, los marcamos y tomamos el registro del peso. Durante una semana llevamos a cabo un proceso de aclimatación, tiempo en el que todos los animales fueron alimentados

con dieta estándar (Chow 5001) y agua ad libitum. Una vez terminado este periodo a las 4 SPN, se inició el paradigma alimentario. Los grupos experimentales quedaron conformados tal como aparecen en la Tabla 2.

Tabla 2. Grupos de trabajo

Identificador de condición	Condición	N	Dieta
<i>h</i>	Hembras control	8	Chow 5001
<i>H</i>	Hembras obesas	12	HFD
<i>m</i>	Machos control	7	Chow 5001
<i>M</i>	Machos obesos	13	HFD

Se sometió a las ratas Wistar machos y hembras al paradigma alimentario reportado en la tabla 2 por 18 semanas. Dado que la HFD tenía una consistencia suave, se añadieron palos de madera (de 9 cm largo por 0.6 cm de ancho) estériles en el contenedor de alimento junto con la dieta obesogénica para promover el desgaste dental que llevan a cabo estos animales al roer

8.3 Estrategia experimental

Durante las 18 semanas del paradigma alimentario realizamos un monitoreo constante de los animales, verificamos que no presentaran rasgos de estrés (excreción de porfirinas, anomalías en las heces y el pelaje) así como la verificación de un estado inicuo del alimento y el agua. Al final del paradigma alimenticio, realizamos la caracterización del modelo mediante el análisis de algunos parámetros metabólicos y somatométricos, para posteriormente evaluar la estructura histológica de las glándulas salivales mayores. Asimismo, esta generación de ratas F0, la apareamos con ratas Wistar en normopeso, para evaluar el efecto intergeneracional de la obesidad parental sobre el metabolismo, somatometría y estructura histológica de las glándulas salivales mayores en la progenie.

8.3.1 Estandarización del modelo de obesidad en la generación F0

Para determinar la efectividad de la aplicación del paradigma alimentario sobre el metabolismo y el peso de las ratas de la generación F0, registramos el peso inicial de todos los animales y a partir de la exposición a la dieta obesogénica empezamos el conteo de la semana 1 hasta la 18. Durante este periodo tomamos registro del

peso corporal y de la ingesta calórica. Al final del paradigma alimentario a todos los animales les realizamos una prueba intraperitoneal de tolerancia a la glucosa, y otra de sensibilidad a la insulina. Posteriormente seleccionamos una cohorte en la que determinamos los niveles de glucemia basal en sangre; insulina basal, lipidemia y leptinemia en plasma sanguíneo.

8.3.1.1 Cinética de ganancia de peso

Para determinar los efectos de la dieta HFD sobre el tamaño de los animales, realizamos, durante la totalidad del paradigma alimentario, una cinética de la ganancia de peso (g), registrando el peso corporal con una balanza electrónica marca Biomédica modelo 2002, a una hora fija el mismo día de cada semana.

8.3.1.2 Cinética de ingesta calórica

Con el objetivo de determinar la cinética del consumo calórico de los animales en experimentación, registramos semanalmente la cantidad individual de alimento consumido en gramos durante 24 horas. La ingesta calórica fue calculada de la siguiente manera:

- 1) Durante todo el paradigma alimentario colocamos, el mismo día de la semana, una cantidad conocida de alimento (A_i) en cada jaula a ZT4.
- 2) Al día siguiente a ZT4 se pesó la cantidad de alimento restante (A_f) en cada jaula
- 3) La cantidad en gramos (g) de alimento final (A_f) se sustrajo de la cantidad inicial (A_i) y esta cantidad se dividió entre el número de animales alojados en la jaula (n), de esta forma determinamos el consumo de alimento individual (c) en gramos, es decir: $c = (A_i - A_f)/n$
- 4) Para obtener el consumo calórico individual, multiplicamos el consumo de alimento (c) en gramos, por su equivalente en kilocalorías, esto de acuerdo a la dieta que consumió cada animal, es decir: 4.09 Kcal/g para el grupo NFD (chow 5001) y 5.82 Kcal/g para el grupo HFD

8.3.1.3 Pruebas metabólicas

Para evaluar el estado metabólico de los animales en experimentación, al final de la semana 17 de exposición al paradigma alimentario, se realizó una prueba intraperitoneal de tolerancia a la glucosa y otra de sensibilidad a la insulina. Estas pruebas se aplicaron justo una semana antes de finalizar el paradigma alimentario, con el fin de no alterar los parámetros metabólicos y la toma de muestras biológicas al momento de la eutanasia la cual se realizó al final de la semana 18.

a) Prueba intraperitoneal de tolerancia a la glucosa

Determinamos la tolerancia a la glucosa mediante una curva de respuesta a un estímulo exógeno de glucosa. Para propiciar un estado de ayuno, todos los animales fueron restringidos a la ingesta de alimento durante 12 horas previas a la prueba. Pasado este tiempo, tomamos el peso corporal de cada rata y la glucemia basal en sangre mediante una punción distal de la vena caudal, utilizando una lanceta. Obtuvimos los valores de glucemia con la ayuda de un glucómetro comercial SD Check GOLD de la marca Biosensor y tiras reactivas a glucosa de la misma marca, siguiendo las indicaciones técnicas del fabricante. La construcción de la curva de tolerancia a la glucosa consistió en medir la glucemia en sangre de cada animal después de administrar la glucosa mediante una inyección intraperitoneal (IP) de dextrosa al 40% con una dosis final de 2.0 g/Kg, tanto en machos como en hembras. Inmediatamente después de esta IP, registramos la respuesta fisiológica midiendo la glucemia en sangre a los 15, 30, 60, 90 y 120 min. posteriores al estímulo exógeno.

b) Prueba intraperitoneal de sensibilidad a la insulina

Para determinar la sensibilidad a la insulina realizamos una curva de respuesta fisiológica a un estímulo de insulina exógena. Todos los animales fueron sometidos a un ayuno de 12 horas y pasado este tiempo registramos tanto el peso corporal como la glucemia basal de cada rata, de la misma forma que hicimos en la curva de tolerancia a la glucosa. El estímulo de insulina exógena fue dado mediante la administración intraperitoneal (IP) de una dosis de 0.2UI/Kg de peso a partir de una solución de insulina humana recombinante de acción rápida a una concentración inicial de 0.2UI/ml. Utilizando la misma metodología que se describe anteriormente para la curva de glucosa, construimos la curva de la respuesta fisiológica a la

insulina mediante la medición de los niveles de glucemia sangre a los 15, 30, 60, 90 y 120 min. después del estímulo exógeno.

8.3.1.4 Eutanasia

Al finalizar el paradigma alimentario, luego de 18 semanas de exposición a las dietas NFD y HFD, seleccionamos una cohorte representativa de cada uno de los grupos de la generación F0 para obtener las muestras sanguíneas y las biopsias de los diferentes tejidos analizados: **h**: n= 5; **H**: n=8; **m**: n=5 y **M**: n=9.

Los animales seleccionados fueron sometidos a un ayuno de 12 horas previas a la eutanasia. Una vez terminado el tiempo de ayuno, obtuvimos la glucemia basal y el peso de cada rata, con este último dato calculamos la cantidad de anestésico a administrar. El anestésico utilizado fue pentobarbital sódico en una concentración de 63 mg/ml aplicado vía IP, en una dosis de 60mg/kg para las hembras y de 100mg/Kg para los machos, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

8.3.1.5 Somatometría

Con el fin de evaluar el efecto de las dietas sobre la somatometría de las ratas, una vez que los animales se encontraban bajo el efecto de la anestesia tomamos las medidas de peso corporal (g), talla (cm) y circunferencia abdominal (cm), utilizando una cinta métrica de plástico flexible con escala milimétrica (mm).

a) Circunferencia abdominal

Colocamos a cada rata de forma perpendicular a la cinta métrica en posición dorsal, posteriormente la parte más ancha del abdomen del animal (debajo del tórax delimitado por las costillas y sobre la pelvis inmediatamente por arriba de las extremidades traseras), rodeamos con la cinta métrica sin ejercer presión y registramos la circunferencia del abdomen (Gerbaix, Metz, Ringot, & Courteix, 2010)

b) Índice de masa corporal (IMC)

Para obtener el índice de masa corporal (IMC), dividimos el peso corporal del animal en (g) sobre el cuadrado de la talla (cm) de cada animal.

$$\text{IMC} = \frac{g}{\text{cm}^2}$$

El registro de la talla (longitud naso-anal) de cada rata, la realizamos colocando la cinta métrica en una superficie plana y sobre ella situamos a la rata en posición ventral y paralela a la cinta. Colocamos la punta de la nariz en concordancia con el inicio de la métrica 0 cm) y medimos la longitud en centímetros hasta la altura del ano (Novelli et al., 2007).

8.3.1.6 Obtención del plasma sanguíneo

Para la obtención del plasma sanguíneo realizamos una incisión en los animales para abrir desde la zona pélvica hasta el tórax, posteriormente separamos las costillas tanto del costado derecho como del izquierdo para dejar expuesta la cavidad torácica. Mediante una punción cardiaca de la vena cava obtuvimos aproximadamente 3.0 ml de sangre por cada animal. Colectamos el tejido sanguíneo en micro tubos con EDTA 7%. Posteriormente, centrifugamos las muestras a 10,000 rpm durante 10 min., para finalmente separar el plasma del botón celular y lo almacenamos en alícuotas a -80°C hasta su procesamiento.

a) Cuantificación de leptina e insulina en plasma

Para la cuantificación de los parámetros séricos de leptina e insulina, utilizamos dos kits comerciales para ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA). En cuanto a la leptina usamos el kit de la marca Merck Millipore (EZRL-83K) para cuantificar los niveles de esta adipocina en los plasmas de los animales y para la insulina utilizamos el kit para cuantificación de insulina en rata de la marca Mercodia (10-1251-01), en ambos seguimos las recomendaciones metodológicas de los fabricantes.

b) Cuantificación de lípidos séricos

La cuantificación de lípidos séricos consistió en hacer mediciones de triacilgliceroles y colesterol total. Estos análisis fueron realizados en la plataforma de servicios del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, en la cual utilizaron la técnica de espectrofotometría UV-visible.

8.3.1.7 Obtención de muestras de tejido

Después de la eutanasia y la extracción de sangre, sometimos a los animales a un proceso de perfusión con solución salina NaCl 0.9% para drenar la sangre de los tejidos, seguido de paraformaldehído (PFA) 4% para la fijación de los mismos.

a) Tejido adiposo

Después de la perfusión, diseccionamos bilateralmente los panículos de tejido adiposo supragonadal (TASG) y retroperitoneal (TARP) y tomamos una muestra del subcutáneo (TASC). Registramos el peso en gramos de cada uno de estos tejidos (TA) y posteriormente hicimos una correlación con el peso corporal total del animal (p) y obtener la adiposidad de cada animal.

$$TA = \frac{g (TASG+TARP+TASC)}{g (peso corporal)} \times 100\%$$

b) Glándulas salivales mayores

Realizamos la extracción bilateral de las glándulas salivales mayores (parótida, sublingual y submandibular) de cada animal, mediante un corte en la línea media ventral desde el tórax hasta el labio inferior, retirando los nódulos linfáticos, el tejido adiposo y el tejido conectivo que normalmente se encuentran adosados a las glándulas.

Una vez desecadas las glándulas, registramos el peso de la siguiente manera: las glándulas parótidas como un solo elemento y el complejo anatómico formado por las glándulas salivales submandibulares y sublinguales como un segundo elemento.

El peso de las glándulas salivales fue relacionado con el peso corporal de cada animal, obteniendo así el porcentaje de tejido glandular.

$$\mathbf{GP} = \frac{g \text{ (Par de GSP)}}{g \text{ (peso corporal)}} \times 100\%$$

$$\mathbf{GSM-SL} = \frac{g \text{ (Paquete GSM-SL)}}{g \text{ (peso corporal)}} \times 100\%$$

8.3.2 Análisis histológico de las glándulas salivales mayores

Posterior al pesaje de las glándulas salivales mayores, mantuvimos los tejidos en paraformaldehído (PFA) al 4% por 24 h, transcurrido este tiempo los colocamos en PBS 1X durante 24h y finalmente en una solución de PBS/Azida de sodio al 0.01% hasta el momento de su procesamiento histológico.

Para el procesamiento histológico, deshidratamos los tejidos con un tren de alcoholes graduales y subsecuentes al 50, 60, 70, 80, 96 (2 pasajes) y 100% (2 pasajes); posteriormente para aclarar el tejido se utilizó Xilol al 100% (2 pasajes). Finalmente, incluimos los tejidos correspondientes a cada glándula fueron en parafina. A partir de los bloques de parafina, para cada glándula salival obtuvimos cortes histológicos seriados de un grosor de 4µm a tres diferentes profundidades con una diferencia de 100 micras en un micrótomos estándar de la marca Leica.

a) Tinción de Hematoxilina – Eosina (HE)

Teñimos todas las glándulas parótidas utilizando un tren de tinción de Hematoxilina-Eosina, que nos permitió visualizar los acinos serosos que las conforman. Para realizar esta tinción, desparafinamos los cortes de tejido con xilol al 100% y los rehidratamos usando dos cambios de etanol absoluto, seguidos de dos cambios de alcohol al 96%. Posteriormente, expusimos las laminillas con los cortes a una tinción directa con Hematoxilina de Gil por 5 minutos, después para crear un mayor contraste enjuagamos y lavamos con una solución de carbonato de litio al 1% y los contratiñimos con Eosina amarillenta alcohólica por 1 minuto. Al cabo de este tiempo, deshidrataron nuevamente los tejidos usando dos cambios de etanol al 96% y dos cambios en etanol absoluto. Finalmente, aclaramos los tejidos con xilol al 100% y los montamos para su preservación en resina sintética.

b) Tinción de Ácido Peryódico Schiff (PAS)

Debido a que tanto las glándulas salivales submandibulares como las sublinguales contienen acinos mucosos, para su tinción se utilizó el método de tinción de PAS, con el cual se marcan diversos mucopolisacáridos como la mucina presente en los acinos mucosos de estos dos tipos de glándulas y, por lo tanto, se facilita la visualización y la cuantificación de estas estructuras.

Para llevar a cabo la tinción de PAS, primero desparafinamos los cortes de tejido con xilol al 100% y los rehidratamos usando dos cambios de etanol absoluto seguidos de dos cambios de alcohol al 96%. Una vez los cortes rehidratados, los colocamos en ácido peryódico durante 10 minutos. Posteriormente los expusimos al reactivo de Schiff a temperatura ambiente por 10 minutos, transcurrido ese tiempo, retiramos el reactivo y revelamos con agua tibia para forzar el viraje a color rosa intenso. Después, contratiñimos los cortes con Hematoxilina de Gil por dos minutos y los deshidratamos usando dos cambios de etanol al 96% y dos cambios de etanol absoluto. Finalmente, aclaramos los tejidos con xilol y los montamos para su preservación en resina sintética.

8.3.2.1 Cuantificación de acinos

Para poder llevar a cabo la cuantificación de los acinos serosos y mucosos de las glándulas salivales, realizamos reconstrucciones microfotográficas de los cortes histológicos a un aumento de 40X con ayuda del microscopio óptico y el software ZEN Blue de Zeiss. Estas imágenes fueron tomadas con su escala correspondiente en micrómetros (um). Para poder realizar la cuantificación de los acinos glandulares estandarizamos un protocolo de análisis con el software FIJI/ImageJ: primero todas las imágenes producidas se exportaron a formato tiff para poder ser analizadas con el procesador de imágenes FIJI/ImageJ, estas microfotografías fueron calibradas según su escala y se determinó una región de interés o ROI por “*Region of interest*”, la ROI se refiere a una parte de la imagen que se desea filtrar u operar con algún algoritmo para hacer alguna anotación o medición. Una vez realizada la calibración de las imágenes, utilizamos la función “Grid...” de FIJI/ImageJ para generar una gradilla de 24 cuadrantes numerados sobre la ROI establecida (312,000 micras ²). Posteriormente, se determinó que el número de cuadrantes a analizar en cada imagen era de 8, estos cuadrantes se eligieron al azar mediante la función =ALEATORIO.ENTRE() en una hoja de cálculo del programa Excel Microsoft. Antes

de iniciar la cuantificación de los acinos establecimos los siguientes criterios de inclusión para evitar hacer cuantificaciones repetidas:

- a) Sólo se contaron los acinos glandulares completos que se encontraban dentro del cuadrante, los incompletos quedaron sistemáticamente fuera de la cuantificación.
- b) Cuando los acinos glandulares se encontraban tocando los bordes del cuadrante, se incluyeron en la cuantificación únicamente aquellos que se encontraban en los bordes derecho e inferior de cada cuadrante.

Posteriormente, para realizar el conteo de los acinos glandulares en los ocho cuadrantes elegidos, utilizamos la herramienta “cell counter” de FIJI/ImageJ, que nos permitió realizar cuantificaciones independientes en diferentes zonas de una misma imagen, esta herramienta despliega un panel en el que se van contabilizando automáticamente los acinos marcados manualmente para cada cuadrante (Fig.3).

Finalmente, los resultados de la cuantificación se guardaron en un formato xsl para trabajarlos posteriormente en Excel y extrapolarlos al área total del campo (ROI).

$$\text{Acinos} = \frac{(\text{Promedio de acinos}) (\text{área del ROI})}{\text{área de cuadrante}}$$

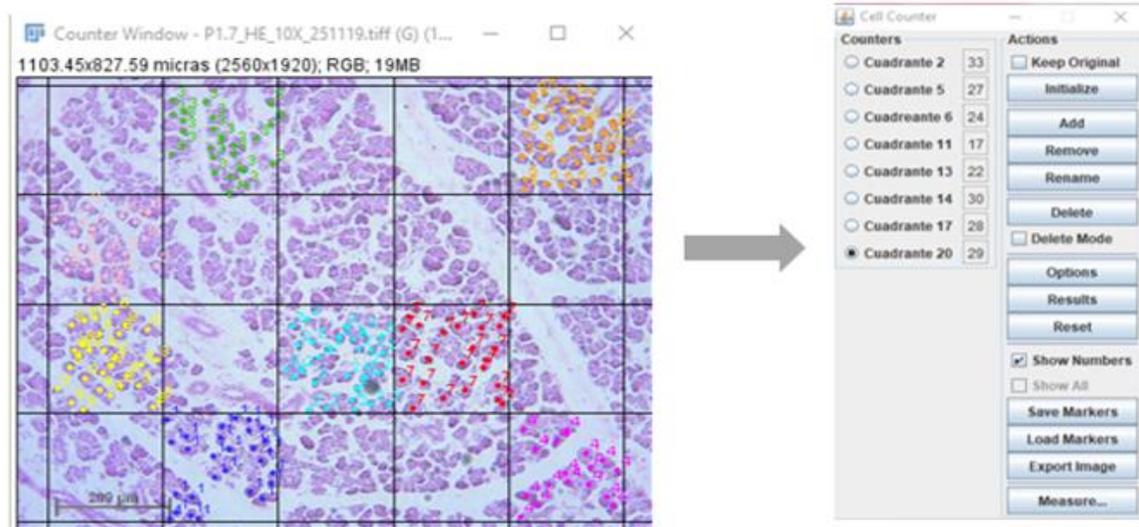


Figura 5. Metodología utilizada en el programa FIJI/ImageJ para la cuantificación de acinos en las glándulas parótidas de rata Wistar. Tinción con H&E

8.4 Obtención de la progenie (F1) de ratas Wistar

Para obtener la generación F1 a partir de las ratas F0 alimentadas tanto con la NFD como con la HFD, al finalizar las 18 semanas de aplicación del paradigma alimentario, seleccionamos una cohorte de ratas de todos los grupos experimentales para cruzarlos con animales en normopeso: **h**: n= 3; **H**: n=4; **m**: n=3 y **M**: n=4.

Todos los animales fueron cruzados con ratas de entre 250-300 g de peso corporal (normopeso). En el caso de las hembras F0 (h y H), cada una fue cruzada con 1 macho en normopeso. En cambio, los machos F0 (m y M) fueron cruzados cada uno con dos hembras en normopeso.

El tiempo de apareamiento fue de 1 semana, lapso en el que las parejas en cruce permanecieron en ciclos de luz/oscuridad de 14/10h, con el fin de mimar las condiciones de luz más adecuadas para el apareamiento. Durante este periodo alimentamos a todos los animales con dieta estándar (NFD: chow 5001). Una vez finalizado el periodo de apareamiento, mantuvimos a las hembras en jaulas individuales hasta el momento del parto y restablecimos el régimen alimenticio en las hembras del grupo HFD durante los 21 a 22 días del periodo gestacional (excepto en las hembras que fueron cruzadas con machos del grupo HFD, para así evaluar únicamente el efecto de la alimentación paterna)

Para fijar condiciones iguales de alimentación de las crías F1, al finalizar el parto, sustituimos la dieta obesogénica de las madres F0 (h y H) por una dieta estándar NFD con la finalidad de excluir la exposición a la HFD durante el periodo de lactancia. Asimismo, se hizo una reducción de camadas para que cada madre F0 amamantara únicamente 8 crías F1: 4 machos y 4 hembras por camada.

8.5 Evaluación del efecto intergeneracional de la obesidad parental

Posterior al periodo de lactancia (21 días), destetamos, pesamos, marcamos y separamos en parejas o tríos a todas las crías de la generación F1 dependiendo de su condición parental. Todos los animales fueron alojados bajo ciclos de luz/oscuridad de 12/12 h, alimentados con dieta estándar y agua *ad libitum* hasta que alcanzaron la edad adulta a las 18 semanas postnatales. Los grupos de trabajo de la generación F1 se identificaron de acuerdo con la Tabla 3.

Tabla 3. Grupos de experimentales de la generación F1

Condición parental F0	Sexo F1	Identificador de grupo F1	Dieta
<i>Padres normopeso</i>	Hembras	mh	Chow 5001
	Machos	mm	
<i>Madres normopeso</i>	Hembras	hh	
	Machos	hm	
<i>Madre obesa</i>	Hembras	Hh	
	Machos	Hm	
<i>Padre obeso</i>	Hembras	Mh	
	Machos	Mm	

Inmediatamente después de la ablactación o destete y durante las siguientes 15 semanas de vida independiente de la generación F1, realizamos el seguimiento de la ganancia de peso y el consumo calórico, siguiendo la misma metodología reportada en esta tesis para la generación F0.

Por otro lado, en la semana 17 postnatal, y siguiendo la misma metodología que se reportó para la generación F0, realizamos las pruebas intraperitoneales de tolerancia a la glucosa y de sensibilidad a la insulina para todos los animales F1 con el fin de evaluar el efecto de la obesidad parental sobre el estado metabólico de su progenie.

8.5.1 Eutanasia de F1

Cuando la generación F1 cumplió 18 semanales postnatales, seleccionamos una cohorte representativa de cada uno de los seis grupos (ver tabla 3), para obtener los pániculos de tejido adiposo, las glándulas salivales mayores, así como las muestras de plasma. De la misma forma que para la generación F0, los animales fueron sometidos a un ayuno de 12 horas previas a la eutanasia. Una vez terminado el tiempo de ayuno, obtuvimos la glucemia basal en sangre y el peso corporal de cada rata. El anestésico utilizado fue pentobarbital sódico IP, en las mismas dosis que se reportaron para la generación F0.

8.5.2 Somatometría de F1

Con el objetivo de evaluar el efecto de la obesidad parental sobre la somatometría de las ratas F1, tomamos medidas de peso corporal (g), talla (cm) y circunferencia

abdominal (cm), al momento de la eutanasia utilizando las mismas técnicas reportadas en la generación F0.

8.5.3 Obtención de muestras de plasma y tejidos de F1

Al momento de la eutanasia de la generación F1, de la misma forma en que se describió para la generación F0, obtuvimos muestras de plasma para analizar los niveles de insulina basal. Asimismo, para obtener la adiposidad total de los animales llevamos a cabo la disección bilateral completa de los panículos adiposos retroperitoneales y supragenadales y tomamos una muestra del subcutáneo. También se desecaron bilateralmente las glándulas salivales mayores para realizar el análisis histológico y evaluar el efecto de la obesidad parental sobre la estructura histológica de las glándulas salivales mayores de la generación F1.

8.6 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de todas las variables que se obtuvieron en el presente estudio, se utilizó el programa de cálculo R Studio. Las variables se describieron con medidas de tendencia central. Para los datos que mostraron una distribución normal, se utilizó la prueba de t de Student y para los datos que arrojaron una dispersión anormal utilizamos la prueba alternativa no paramétrica, la U de Mann-Whitney. Se estableció una diferencia significativa entre los grupos analizados estadísticamente cuando la *p-value* fue menor o igual a 0.05

9.1 Modelo de obesidad inducida por una dieta alta en grasas (HFD) en ratas Wistar hembra y macho

Después de llevar a cabo la aplicación del paradigma alimentario de 18 semanas en un grupo de ratas Wistar de hembras (h) y machos (m) alimentados con dieta estándar (NFD) y compararlo con otro grupo de hembras (H) y machos (M) que se alimentaron con una dieta alta en grasas (HFD), pudimos observar que los animales del grupo HFD (H y M) presentaron valores significativamente mayores en los parámetros relacionados a: la ganancia de peso corporal, la ingesta calórica, la adiposidad, la glucosa basal y curva de tolerancia a glucosa, los niveles plasmáticos de leptina y el colesterol total, este último parámetro sólo fue diferente en machos.

9.1.1 Ganancia de peso corporal e ingesta calórica

Al analizar la cinética de ganancia de peso corporal, observamos que a partir de la semana 8 del paradigma alimentario, tanto las hembras (fig. 6A) como los machos (fig. 6D) de los grupos HFD (H y M), mostraron un aumento significativo en el porcentaje de ganancia de peso corporal con respecto a los grupos control (h y m). Esta diferencia se mantuvo estadísticamente significativa hasta el final del paradigma alimentario (semana 18), a pesar de que, en las hembras, durante las semanas 13, 15 y 16, no mostraron diferencias con respecto a sus controles.

Al final del paradigma alimentario, las hembras del grupo control (h) presentaron una ganancia de peso de $226 \pm 5.6\%$, mientras que las del grupo HFD (H) ganaron el $250 \pm 5.3\%$ de su peso inicial, es decir se registró una diferencia del $24 \pm 0.3\%$ más con respecto al grupo control (fig.6B). En cuanto a los machos, el grupo control (m) ganó el $578 \pm 16.5\%$ de su peso inicial, mientras que el grupo HFD (M) ganó un $633 \pm 15\%$, lo que se traduce en aumento significativo del $55 \pm 1.5\%$ con respecto al grupo de machos control (fig. 6E).

Por otro lado, también se midió la conducta alimentaria a través del consumo calórico individual, como se puede observar en las gráficas fig. 6C y fig. 6F, tanto en hembras como en machos, la ingesta calórica no presentó un patrón global específico. Sin embargo, a pesar de que la conducta alimentaria fue fluctuante, se

observan patrones similares de consumo entre machos y hembras. Las hembras presentaron diferencias estadísticas en las semanas 1, 2, 3 y 4, donde el grupo HFD (H) tuvo una ingesta calórica menor al grupo control, luego en las semanas 7 y 8, este mismo grupo aumentó significativamente su ingesta, pero para las semanas 11 y 17 volvió a disminuir en comparación al grupo control (h) (fig. 6C). En los machos se observó un fenómeno similar, en las semanas 1 y 4, la ingesta calórica del grupo HFD (M) fue menor al grupo control (m), después en las semanas 5 y 9, los machos HFD aumentaron su ingesta calórica y finalmente para las semanas 13,14,16 y 17, nuevamente el grupo HFD (M) presentó una ingesta menor con respecto al grupo control (m) (fig. 6F).

9.1.2 Somatometría de ratas Wistar hembra y macho generación F0

La somatometría se realizó para todos los grupos al final del paradigma alimentario mediante la evaluación de la circunferencia abdominal (cm) y el cálculo del índice de masa corporal (IMC) utilizando los parámetros de la talla (cm) y el peso corporal (g).

Se obtuvo la cuantificación de la acumulación de tejido adiposo en la región abdominal midiendo la circunferencia (cm). Este parámetro no arrojó diferencias significativas entre los grupos alimentados con la HFD (H y M) y los animales control (h y m) que siguieron una dieta NFD (Tabla 4). Por otro lado, el análisis de la relación entre la talla y el peso corporal, es decir, el índice de masa corporal (IMC), alcanzado al final del paradigma alimentario, mostró que no existieron diferencias significativas entre el grupo de hembras HFD (H) y las hembras control (h). Sin embargo, los machos del grupo HFD (M) presentaron un IMC de 0.72 ± 0.02 con respecto al IMC de 0.67 ± 0.004 que presentó el grupo de machos control (m), es decir, un aumento estadísticamente significativo de 0.05 (Tabla 4). Estos resultados indican que el efecto de la alimentación con la dieta alta en grasas tuvo un mayor impacto sobre la somatometría de los machos que de las hembras. Este resultado se asocia positivamente con la ganancia de peso corporal, en donde observamos que el grupo de machos HFD (M) presentó una ganancia significativa de peso 50% mayor con respecto al grupo de machos control (m), mientras que la ganancia que obtuvieron las hembras HFD (H) fue únicamente 24% mayor comparadas con su grupo control (h) (fig. 6C y D).

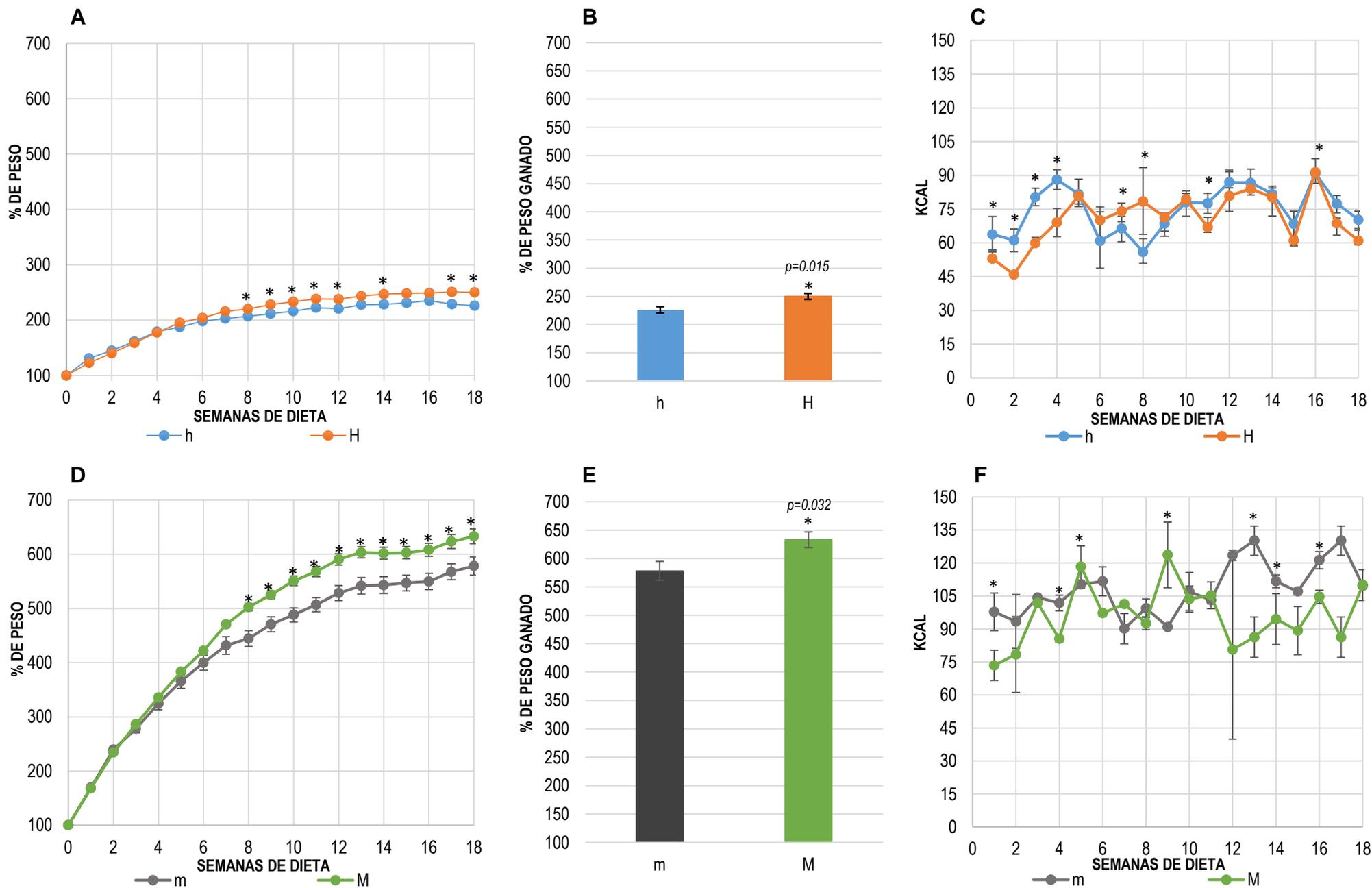


Figura 6. Ganancia porcentual de peso corporal e ingesta calórica de la generación F0 de ratas Wistar hembra y macho. A) Cinética del porcentaje de la ganancia de peso corporal en hembras h y H; **B)** Cinética del porcentaje de la ganancia de peso corporal en machos m y M; **C)** Porcentaje de la ganancia total de peso corporal en hembras h y H; **D)** Porcentaje de la ganancia total de peso corporal en machos m y M; **E)** Cinética de la ingesta calórica (Kcal) en hembras h y H; **F)** Cinética de la ingesta calórica (Kcal) en machos m y M. Se muestran las gráficas de los promedios de cada parámetro \pm SEM. Se realizó una prueba de *t de student* para cada parámetro. El símbolo: (*) indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre grupos (p -value<0.05). **h**: hembras control; **H**: hembras HFD; **m**: machos control; **M**: machos HFD.

9.1.3 Adiposidad de ratas Wistar hembra y macho generación F0

Los resultados correspondientes a la adiposidad corporal total (AT) acumulada a lo largo del paradigma alimentario, muestran que en las hembras (fig. 7A) el almacenamiento de tejido adiposo en el grupo HFD (H) fue del 4.87%, una proporción mayor con respecto al 2.41% del grupo control (h), esta diferencia fue prácticamente del doble (2.46%). De la misma manera, los machos del grupo HFD (M) presentaron un porcentaje del 6.87% frente al 3.3% de adiposidad total del grupo control (m) (fig. 7B), mostrando así una ganancia importante del 3.57% de tejido adiposo total, es decir más del doble cuando se compara con el control.

Al mismo tiempo se puede observar que esta adiposidad corporal total, se desglosa en el acumulo de tejido adiposo visceral (TAV) y de tejido adiposo subcutáneo (TASC) (fig.7). Para las hembras (fig. 7A), el porcentaje de TAV en las HFD (H), fue de 3.77%, mientras que las controles (h) presentaron una acumulación de sólo un 1.75%, esto se traduce en que las hembras HFD (H) ganaron un 2.02% más de TAV que las controles (h). Asimismo, el porcentaje de TASC fue mayor en las hembras HFD (H), quienes acumularon 1.11% de este tejido, en cambio las hembras control acumularon 0.66%, es decir, las hembras HFD (H), presentaron un porcentaje de TASC 0.45% mayor al control (h). Un fenómeno similar se describe en los machos (fig. 7B), donde el acumulo de TAV fue mayor en los machos HFD(M), con un acumulo del 6.32%, mientras que los machos control acumularon sólo un 2.78% de este tejido, lo que nos indica una diferencia de 3.54%. En cuanto al TASC, de la misma forma que en hembras, los machos HFD(M) acumularon 1.12% de este tejido, es decir, 0.31% mayor que el porcentaje acumulado por los machos control (m), que fue de 0.82%.

Estos resultados nos indican que el efecto de la ingesta de la dieta alta en grasas para los grupos H y M, promovió una acumulación significativamente mayor de tejido adiposo en diferentes zonas del cuerpo con respecto a los grupos control h y m. Esta observación nos permite postular que la ganancia de tejido adiposo está relacionada con la composición de la dieta, que como lo mencionamos anteriormente, también se ve reflejada en una ganancia de peso corporal mayor en los grupos H y M con respecto a los grupos control (h y m).

9.1.4 Análisis de marcadores bioquímicos de ratas Wistar hembra y macho generación F0

De acuerdo con el análisis bioquímico que se realizó sobre las muestras de plasma sanguíneo, observamos que el estado de leptinemia en las ratas hembra (H) y macho (M) HFD fue significativamente mayor con respecto a los grupos control h y m (Tabla 5). Para las hembras control (h) y HFD (H) registramos niveles de leptina

de 1.6 ± 1.23 ng/ml y 6.7 ± 1.45 ng/ml respectivamente, es decir las hembras alimentadas con la dieta alta en grasas (H) reportaron en promedio una diferencia de 5.1 ng/ml con respecto al grupo control (h), lo que se traduce en un aumento de 4 veces los niveles basales de esta adipocina en el plasma. En cuanto a los valores de leptina que registramos para los machos, la diferencia no fue tan importante pero sí estadísticamente significativa. Los machos control (m) presentaron 1.03 ± 0.25 ng/ml mientras que en los HFD (M) registramos un promedio de 2.94 ± 1.3 ng/ml, esto es 2,8 veces más cantidad de leptina con respecto al grupo m. Este estado de hiperleptinemia en ambos sexos se correlaciona perfectamente con el alto porcentaje de adiposidad observado para ambos grupos HFD (H y M) (fig.7 A y B).

En cuanto a los resultados del perfil lipídico con el que medimos la cantidad del colesterol total y los triacilgliceroles en el plasma sanguíneo, observamos que las hembras HFD (H) no presentaron diferencias estadísticas con respecto a las hembras control (h) en ninguno de los dos parámetros (Tabla 5). De la misma manera, en los machos observamos que los niveles de triacilgliceroles se mantuvieron muy similares en ambos grupos (M y m) (Tabla 5). Sin embargo, el grupo HFD (M) presentó niveles significativamente mayores de colesterol total en plasma (1.73 mMol/L) con respecto al grupo control (1.33 mMol/L), mostrando así un efecto de hipercolesterolemia por ingesta de la HFD dependiente del sexo.

Los valores registrados de glucemia en condiciones de ayuno indicaron que tanto las hembras (H) como los machos (M) HFD ya cursaban con hiperglucemia al final del paradigma alimentario. Las hembras control (h) presentaron niveles de glucosa de 83.3 ± 1.44 mg/dl frente a los 101.6 ± 1.8 mg/dl del grupo HFD (H), lo que arroja una diferencia significativa de 18,3 mg/dl entre los dos grupos. La evaluación de este mismo parámetro para los machos se comportó de manera similar, ya que para el grupo control (m) registramos 87.6 ± 2.5 mg/dl y para los machos HFD el valor fue de 107.6 ± 1.9 mg/dl es decir un aumento promedio de 20 mg/dl de glucosa en los animales expuestos a la dieta alta en grasas. Ya que en ambos grupos registramos niveles significativamente más altos de glucosa basal en sangre con respecto a sus grupos control (h y m) estos resultados nos advierten sobre una condición de hiperglucemia para los grupos H y M (Tabla 5).

Finalmente, al medir los niveles de insulina plasmática observamos que esta hormona, tanto en hembras (H) como en machos (M) HFD, se mantuvo estadísticamente similar a los grupos control (h y m) (Tabla 5).

Tabla 4. Somatometría de ratas Wistar hembra y macho generación F0

Parámetro	h	H	p-value	m	M	p-value
Circunferencia abdominal (cm)	16.84 ± 1.16	18.01 ± 1.36	0.18	20 ± 0.5	20 ± 0.5	0.3
IMC ($\frac{g}{cm}$) ²	0.56 ± 0.04	0.61 ± 0.07	0.14	0.67 ± 0.004	0.72 ± 0.02	0.002*

Se muestran las medianas ± la desviación cuartil para la evaluación de la circunferencia abdominal y el índice de masa corporal (IMC). Se realizó una prueba de *U de Wilcoxon-Mann-Whitney* para cada variable, el símbolo: (*) indica los valores que arrojaron una diferencia estadísticamente significativa ($p\text{-value} < 0.05$) entre los grupos HFD vs NFD.

h: hembras control, H: hembras HFD, m: machos control, M: machos HFD.

Tabla 5. Análisis de marcadores bioquímicos de ratas Wistar hembra y macho generación F0

Parámetro	h	H	p-value	m	M	p-value
Leptina (ng/mL)	1.6 ± 1.23	6.7 ± 1.54	0.03*	1.03 ± 0.25	2.94 ± 1.3	0.0008*
Colesterol (mmol/L)	1.55 ± 0.16	1.44 ± 0.25	0.4	1.33 ± 0.18	1.73 ± 0.3	0.004*
Triacilglicéridos (mmol/L)	0.44 ± 0.15	0.3 ± 0.18	0.2	0.2 ± 0.1	0.31 ± 0.2	0.09
Glucemia basal (mg/dL)	83.3 ± 1.44	101.6 ± 1.8	2.2e-06*	87.6 ± 2.5	107.6 ± 1.9	1.5e-05*
Insulina (µg/ml)	0.36 ± 0.27	1.32 ± 0.48	0.06	3.47 ± 1.6	5.38 ± 2.8	0.06

Se muestran los promedios ± la desviación estándar (SD) para los valores de glucemia basal e insulina en ayuno, así como la concentración de leptina, colesterol y triacilglicéridos en plasma. Se realizó una prueba de *t de Student* para cada variable, el símbolo: (*) indica los valores que arrojaron diferencias estadísticamente significativas ($p\text{-value} < 0.05$) entre grupos HFD vs NFD. h: hembras control NFD; H: hembras HFD; m: machos control NFD; M: machos HFD.

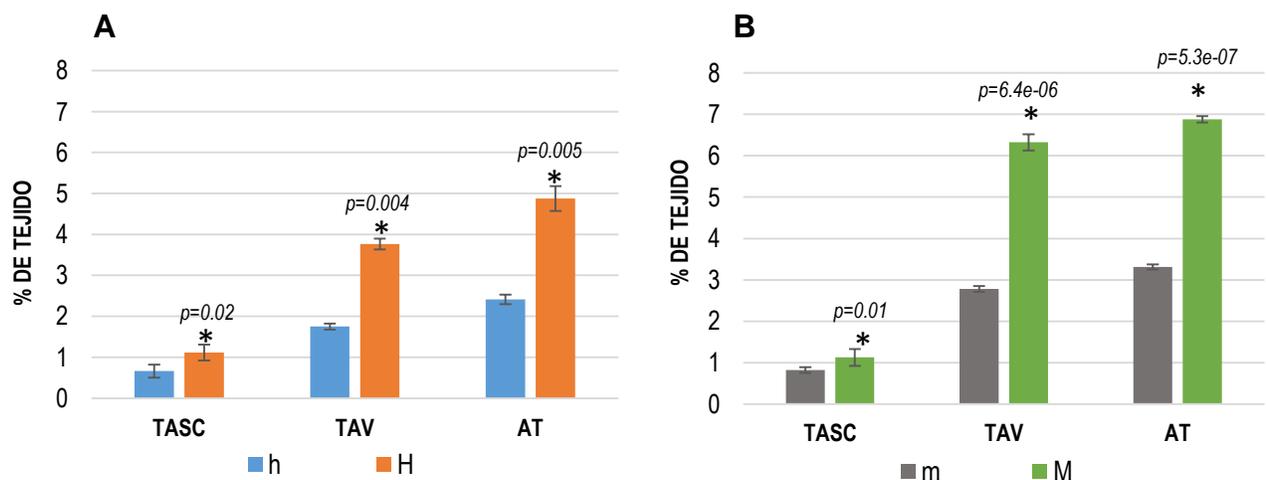


Figura 7. Adiposidad de ratas Wistar hembra y macho de la generación F0. A) Porcentaje de adiposidad de las hembras F0. B) Porcentaje de adiposidad de los machos F0. Se muestran las gráficas de los promedios ± SEM de los diferentes cojinetes adiposos y de la adiposidad total ganada al final del paradigma alimentario. Se realizó una prueba de *t de student* para cada parámetros, el símbolo: (*) indica las diferencias estadísticamente significativas entre grupos HFD y NFD, así como los valores de $p\text{-value} < 0.05$. TASC: tejido adiposo subcutáneo; TAV: tejido adiposo visceral; AT: adiposidad total; h: hembras control; H: hembras HFD; m: machos control; M: macho HFD.

9.1.5 Análisis de las pruebas metabólicas de ratas Wistar hembra y macho de la generación F0

Para evaluar el efecto metabólico de la exposición a la dieta alta en grasas realizamos dos pruebas. En primer lugar, aplicamos una prueba de tolerancia a la glucosa en condiciones de ayuno. Las gráficas de los valores de esta prueba nos permitieron observar que tanto las hembras como los machos HFD (H y M) presentaron un área bajo la curva estadísticamente mayor a los grupos control (fig.8C y D). Las hembras HFD (H) presentaron un área bajo la curva (AUG) de 23239.3, mientras que para las hembras control fue de 28524.3, lo que resulta en un área 22.7% mayor para las hembras HFD. Asimismo, los machos HFD (M) presentaron un AUG de 33653, mientras que los machos control (m) obtuvieron un área de 24725.2, lo que se traduce en un AUG 36% mayor para los machos HFD (M). Sin embargo, durante la elaboración de la cinética del metabolismo de la glucosa, pudimos observar que las hembras HFD (H) presentaron porcentajes de glucosa estadísticamente mayores a su grupo control (h) únicamente a los 15 y 60 minutos posteriores al estímulo de glucosa (fig. 8A), mientras que los machos HFD (M) mostraron porcentajes de glucosa significativamente mayores al grupo control de manera sostenida a lo largo de la cinética a partir de los 30 min y hasta los 120 min posteriores al estímulo exógeno de glucosa (fig. 8B).

En la segunda prueba que realizamos para determinar la sensibilidad del metabolismo a un estímulo exógeno de insulina, los resultados muestran que la curva de sensibilidad en los machos HFD (M) presentó porcentajes de glucosa estadísticamente similares a los porcentajes del grupo control (m) (fig. 9B). De la misma manera, registramos que el área bajo la curva de esta cinética de insulina en sangre fue similar en ambos grupos (m y M) (fig. 9C). Al observar el comportamiento de las hembras HFD (H) únicamente detectamos diferencias significativas en el nivel de glucosa a los 90 min posteriores al estímulo de insulina exógena con respecto al grupo control (h) (fig. 9A). Sin embargo, al analizar el área bajo la curva del grupo HFD (H) observamos que este parámetro fue estadísticamente similar al grupo control (h) (fig. 9C).

De acuerdo con estos resultados, podemos inferir que la exposición a la dieta alta en grasas (HFD), si bien tuvo un efecto negativo sobre el metabolismo de la glucosa, no llegó a alterar el metabolismo de la insulina, ya que no hubo diferencias en las curvas de sensibilidad a la insulina y tampoco en el análisis bioquímico de la insulina plasmática (Tabla 5).

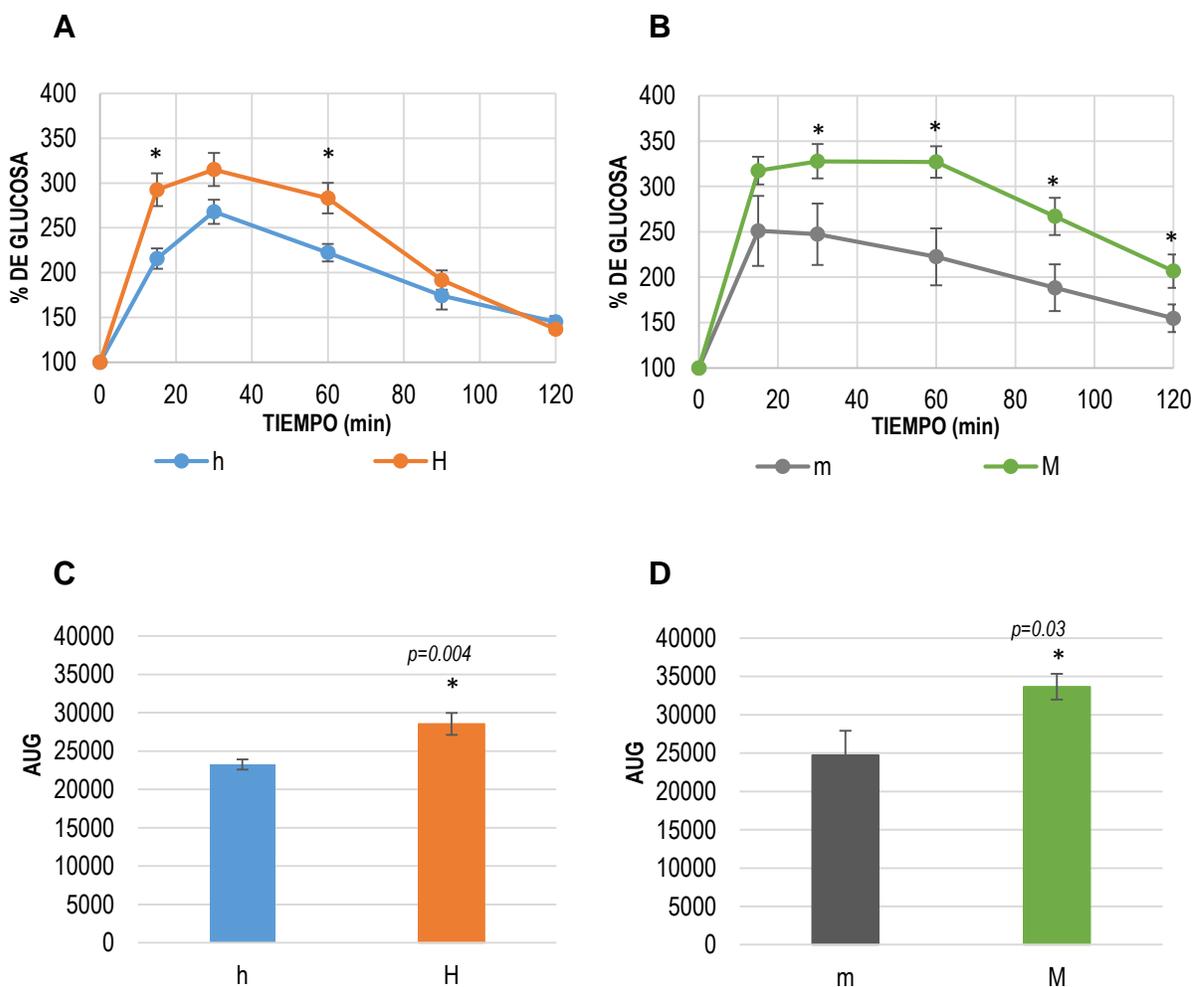


Figura 8. Prueba metabólica de tolerancia a la glucosa en ratas Wistar machos y hembras F0. A) Cinética de tolerancia a la glucosa en hembras h y H; **B)** Cinética de tolerancia a la glucosa en machos m y M; **C)** Área bajo la curva correspondiente a la cinética de tolerancia a glucosa en hembras h y H; **D)** Área bajo la curva correspondiente a la cinética de tolerancia a glucosa en machos m y M. Se muestran los promedios \pm SEM de cada parámetro. Se realizó una prueba de *t de student* para cada punto temporal y para la comparación entre las áreas bajo la curva. El símbolo: (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p\text{-value}<0.05$). **h**: hembras control NFD; **H**: hembras HFD; **m**: machos control NFD; **M**: machos HFD.

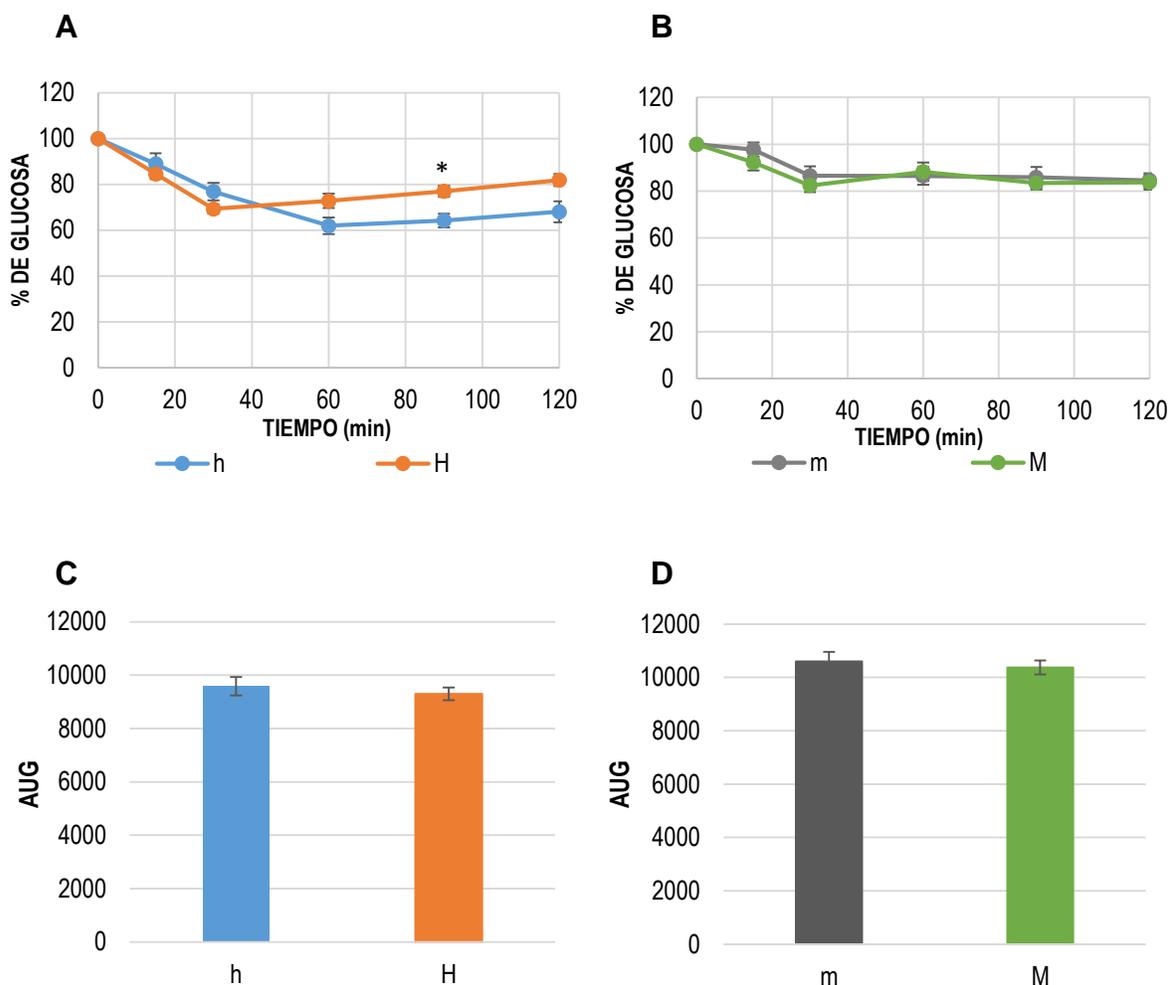


Figura 9. Prueba metabólica de sensibilidad a la insulina en ratas Wistar machos y hembras F0. A) Cinética de sensibilidad a la insulina en hembras h y H; **B)** Cinética de sensibilidad a la insulina en machos m y M; **C)** Cálculo del área bajo la curva correspondiente a la cinética de la sensibilidad a insulina en hembras h y H; **D)** Cálculo del área bajo la curva correspondiente a la cinética de la sensibilidad a insulina en machos m y M. Se muestran los promedios \pm SEM de cada parámetro. Se realizó una prueba de *t de student* para cada punto temporal y para la comparación entre las áreas bajo la curva, no se encontraron diferencias significativas entre grupos ($p\text{-value}<0.05$). **h:** hembras control NFD; **H:** hembras HFD; **m:** machos control NFD; **M:** machos HFD.

9.2 Efecto de la obesidad sobre la histología de las glándulas salivales mayores en ratas Wistar hembras y machos F0

Una vez finalizada la evaluación de los parámetros somatométricos, bioquímicos y metabólicos de las hembras y machos HFD (H y M) los cuales caracterizamos como marcadores de obesidad en las ratas Wistar dentro de nuestro modelo, nos enfocamos a la tarea de responder a la pregunta sobre si la obesidad presente en los animales HFD afectaría la estructura histológica de las glándulas salivales mayores. Para llevar a cabo este análisis realizamos, en primer lugar, la evaluación del peso y la proporción de las glándulas salivales parótida, submandibular y sublingual, para en un segundo tiempo cuantificar el número de los acinos serosos y/o mucosos de cada glándula.

9.2.1 Análisis del peso y la cuantificación de acinos serosos de la glándula salival parótida de ratas Wistar hembras y machos F0

La evaluación de la relación entre el peso de las dos glándulas parótidas (derecha e izquierda) de cada animal con respecto al peso corporal, nos permitió detectar que las hembras alimentadas con HFD (H) presentaron glándulas salivales parótidas con un peso (g) significativamente menor con respecto al grupo control (h) que fue de 0.32 g, este valor contrasta con el calculado para grupo HFD (H) que fue de 0.24 g detectando así una pérdida significativa del 25% del peso (fig. 10A). Sin embargo, esta diferencia no se vio reflejada en la cuantificación de los acinos serosos ya que no arrojó diferencias significativas entre los grupos de hembras (h y H) (fig. 10C). Sorprendentemente, este hallazgo en las hembras, se invirtió en los machos, ya que cuando analizamos los mismos parámetros en el grupo HFD (M), no encontramos diferencias estadísticas en el peso (g) de las glándulas parótidas con respecto al grupo de machos control (h) (fig. 10B) pero, la cuantificación de los acinos serosos mostro que los machos HFD (M) presentaron 378.1 acinos por campo, un número significativamente mayor con respecto al grupo control (m), que obtuvo 280.6 acinos por campo, esto se traduce en que los machos HDF (M), presentaron 34.7% más acinos que los machos control (m) (Fig. 10D).

Los resultados anteriores sugieren que la obesidad tuvo un efecto diferencial sobre el tamaño y la estructura histológica de la glándula parótida de las ratas hembra (H) y macho (M), revelando posiblemente un dimorfismo sexual.

9.2.2 Análisis del peso y la cuantificación de acinos serosos y mucosos de las glándulas submandibular y sublingual de ratas Wistar hembras y machos F0

A diferencia de las glándulas parótidas, las glándulas submandibular y sublingual de roedores, se encuentran empaquetadas en una cápsula de tejido conectivo que las mantiene estrechamente unidas, razón por la que metodológicamente la evaluación de la relación entre el peso (g) de estas glándulas se realizó en conjunto, tal como se describe en la sección de Materiales y métodos de este trabajo. Así pues, los resultados de este análisis no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las ratas HFD (H y M) y sus respectivos controles (h y m) (fig. 11A y 11B).

Por otra parte, cabe recordar que la glándula salival submandibular es una estructura de secreción mixta, en los roedores está compuesta en su mayor parte por acinos serosos, pero también, formando parte de su estructura histológica se encuentra un número menor de acinos mucosos. Mientras que la glándula salival sublingual de los roedores, se compone únicamente de acinos mucosos.

Al cuantificar tanto el número de acinos serosos y mucosos de la glándula submandibular (fig. 11D), como la cantidad de acinos mucosos de la glándula sublingual (fig. 11F) de machos, no observamos diferencias significativas entre los machos HFD (M) con respecto al grupo control (m). Sin embargo, el grupo de hembras HFD (H) resultó tener un número significativamente menor de acinos mucosos en la glándula submandibular, ya que presentaron 37.5 acinos mucosos por campo, mientras que los animales control (h), presentaron 49.2 acinos mucosos por campo, una diferencia de 11.7 acinos (fig. 11C). Finalmente, no se detectaron diferencias estadísticas en el número de los acinos serosos de esta misma glándula submandibular (fig. 11C), ni el número de acinos mucosos que conforman la glándula sublingual (fig. 11E).

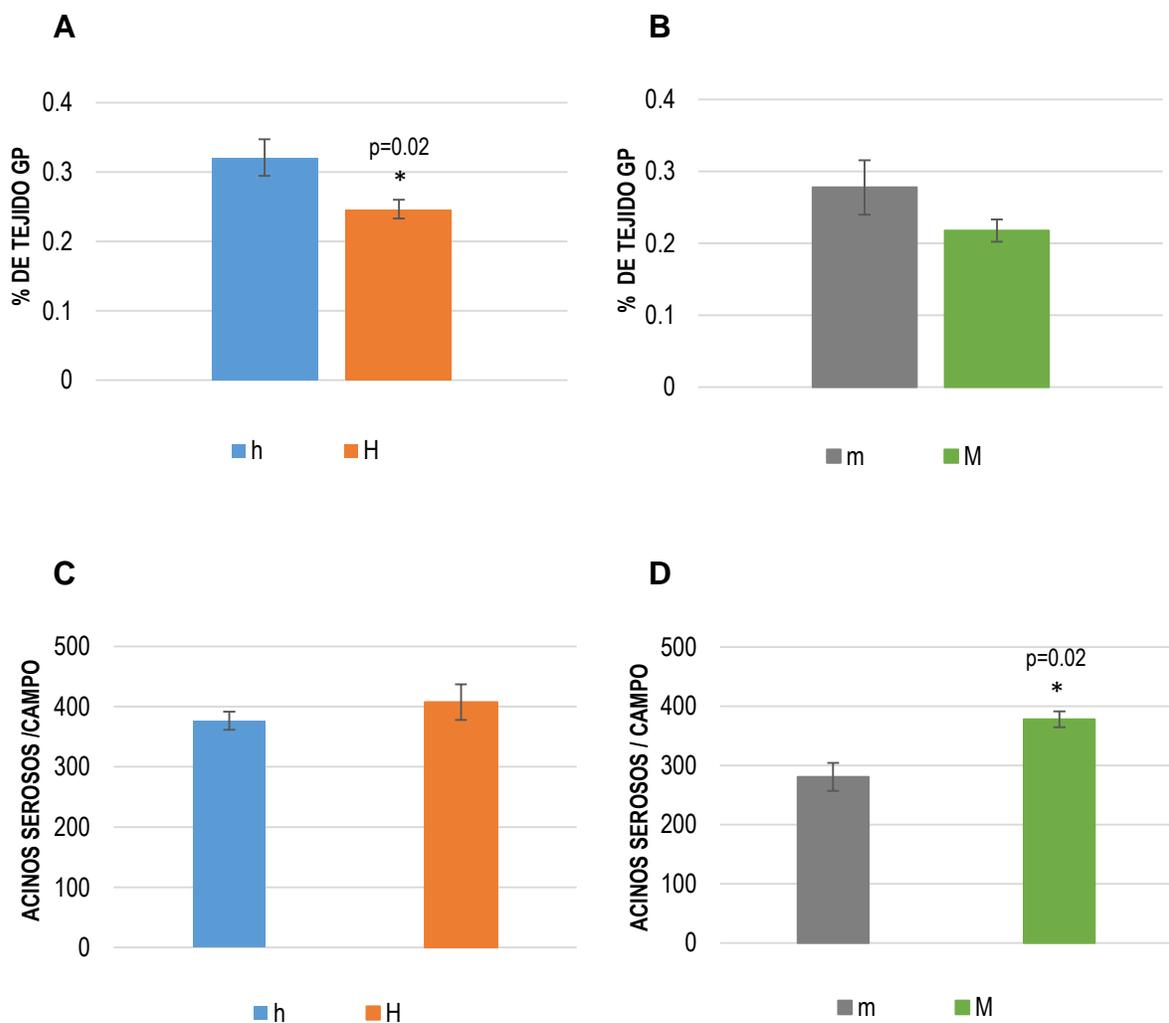


Figura 10. Evaluación de la glándula salival parótida de ratas Wistar machos y hembras F0. A) Análisis del porcentaje de peso de las glándulas salivales parótidas de hembras h y H; **B)** Análisis del porcentaje de peso de las glándulas salivales parótidas de machos m y M; **C)** Cuantificación de los acinos serosos en la glándula salival parótida de hembras h y H; **D)** Cuantificación de los acinos serosos en la glándula salival parótida de machos m y M. Se muestran los promedios \pm SEM de los porcentajes de cada tejido. Se realizó una prueba de *t de student* para cada variable. El símbolo: (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre grupos (p -value<0.05). **m**: hembras control; **M**: hembras HFD; **m**: machos control; **M**: machos HFD.

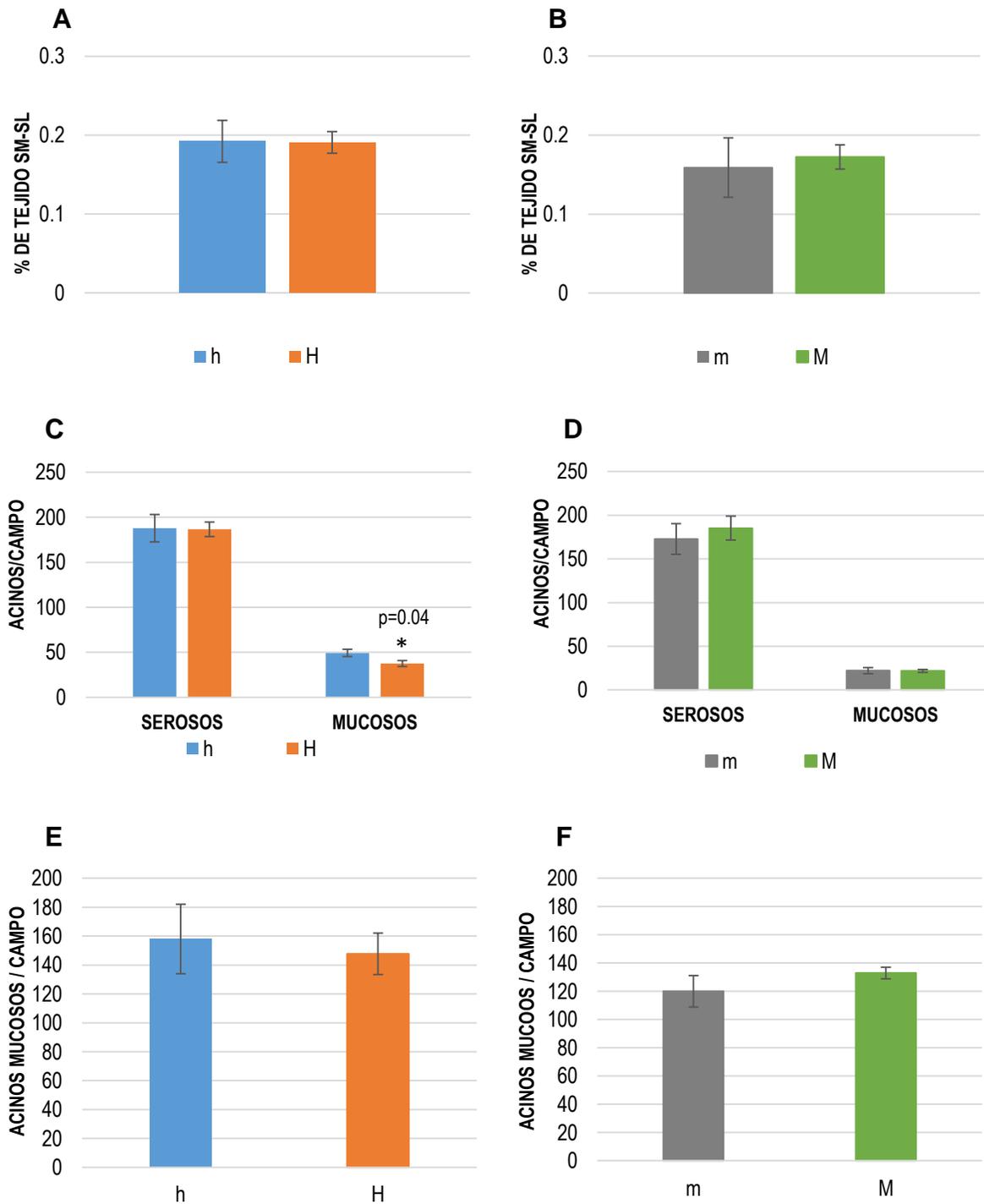


Figura 11. Evaluación del paquete glandular submandibular-sublingual de ratas Wistar machos y hembras F0. **A)** Análisis del porcentaje de peso del paquete glandular submandibular-sublingual de hembras h y H; **B)** Análisis del porcentaje de peso del paquete glandular submandibular-sublingual de machos m y M; **C)** Cuantificación de los acinos serosos y mucosos de la glándula submandibular de hembras h y H; **D)** Cuantificación de acinos serosos y mucosos de la glándula submandibular de machos m y M; **E)** Cuantificación de los acinos mucosos de la glándula sublingual de hembras h y H; **F)** Cuantificación de los acinos mucosos de la glándula sublingual de machos m y M. Se muestran los promedios \pm SEM de los porcentajes de cada tejido. Se realizó una prueba de *t* de student para cada variable. El símbolo: (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre grupos (p -value <0.05). **m**: hembras control; **M**: hembras HFD; **m**: machos control; **M**: machos HFD.

9.2.3 Análisis histológico de las glándulas salivales parótidas de ratas Wistar hembra y macho F0

El grupo de hembras NFD (h), presentó una arquitectura histológica típica de la glándula parótida con la presencia de acinos serosos conformados por células piramidales y núcleos celulares en posición basal, en el citoplasma de algunas células se podían observar múltiples vacuolas. Dentro del estroma del tejido conectivo, se observó el sistema de conductos que presentaron epitelios de células cilíndricas con los núcleos celulares claramente marcados por la tinción con hematoxilina. Comparando esta estructura histológica con la del grupo de hembras HFD (H), observamos que no se presentaron diferencias en la arquitectura, ya que los acinos se encuentran conformados de células piramidales y algunas también presentan vacuolizaciones citoplasmáticas, asimismo el estroma no presentó infiltración de células inmunes o adiposas (Panel 1).

En cuanto a los machos NFD (m), también observamos una estructura histológica típica y similar a la reportada para las hembras (h), con acinos serosos conformados de células piramidales de núcleos basales, estroma con sistema de conductos de epitelio cilíndrico simple. Asimismo, el grupo de machos HFD (M), presentó una estructura histológica similar a la de los machos NFD (m), aunque el análisis digital de estas micrografías arrojó una disminución en el número de acinos serosos por campo para estos machos (M) (Panel 2).

9.2.4 Análisis histológico de las glándulas salivales submandibulares de ratas Wistar hembra y macho F0

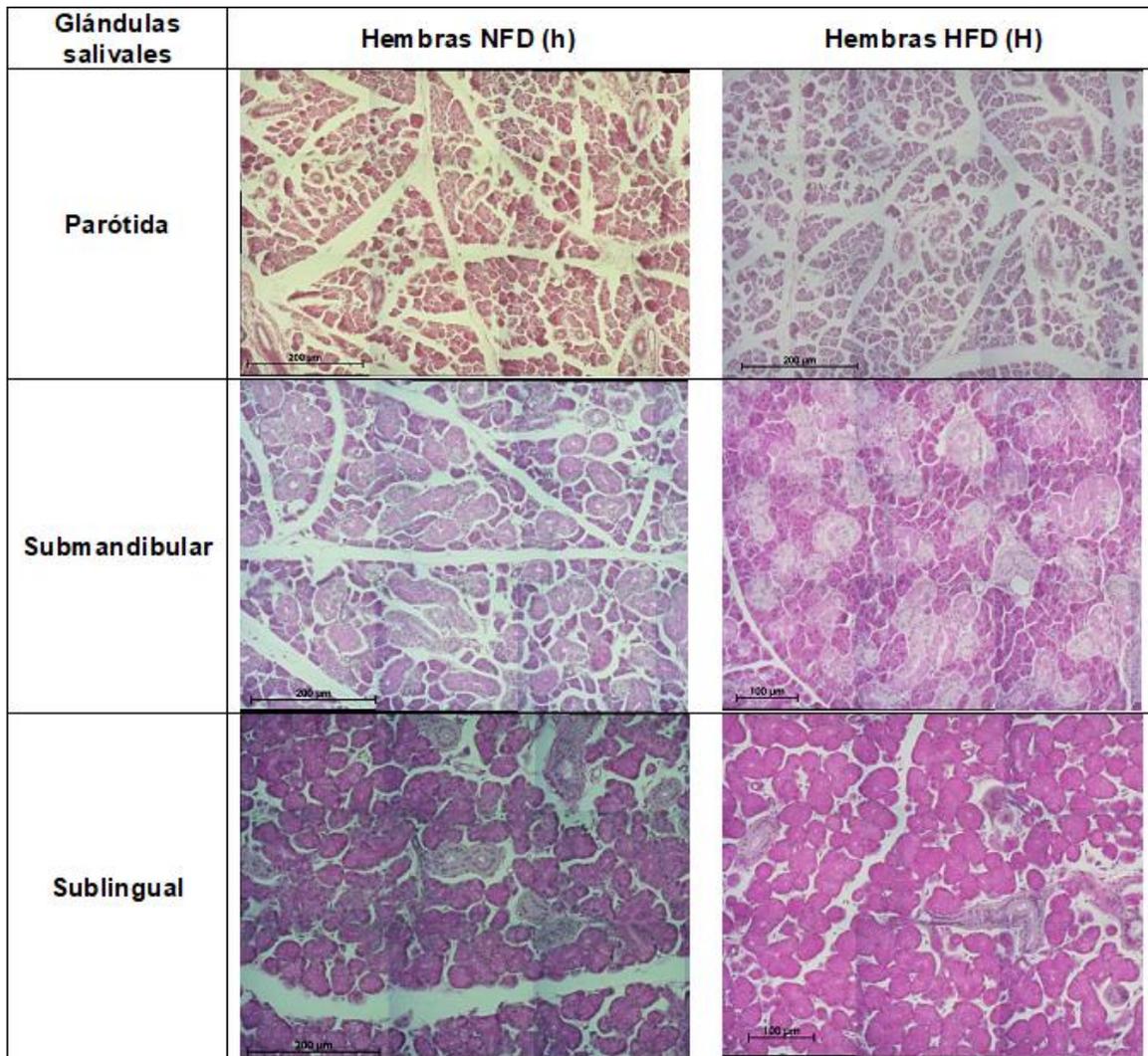
Las glándulas submandibulares de las hembras NFD (h), presentaron una estructura histológica típica, conformada por abundantes acinos serosos de células piramidales y núcleos ubicados hacia la cara basal, y, pocos acinos mucosos conformados también por células piramidales de núcleos basales, así como un estroma de tejido conectivo donde se localizaron a los conductos de epitelio cilíndrico simple. Asimismo, el grupo de hembras HFD (H), presentó una estructura histológica similar. Aunque el análisis digital con ImageJ indicó que este grupo presentó una disminución en el número de acinos mucosos (Panel 1).

Los machos (M y m) muestran una abundante vacuolización de las células piramidales de acinos serosos en comparación con las hembras (H y h). Sin embargo, entre el grupo de machos HFD (M) y NFD (m) no se observamos diferencias histológicas ni cualitativas ni cuantitativas, ambos grupos presentaron una estructura histológica típica con células piramidales con los núcleos basales,

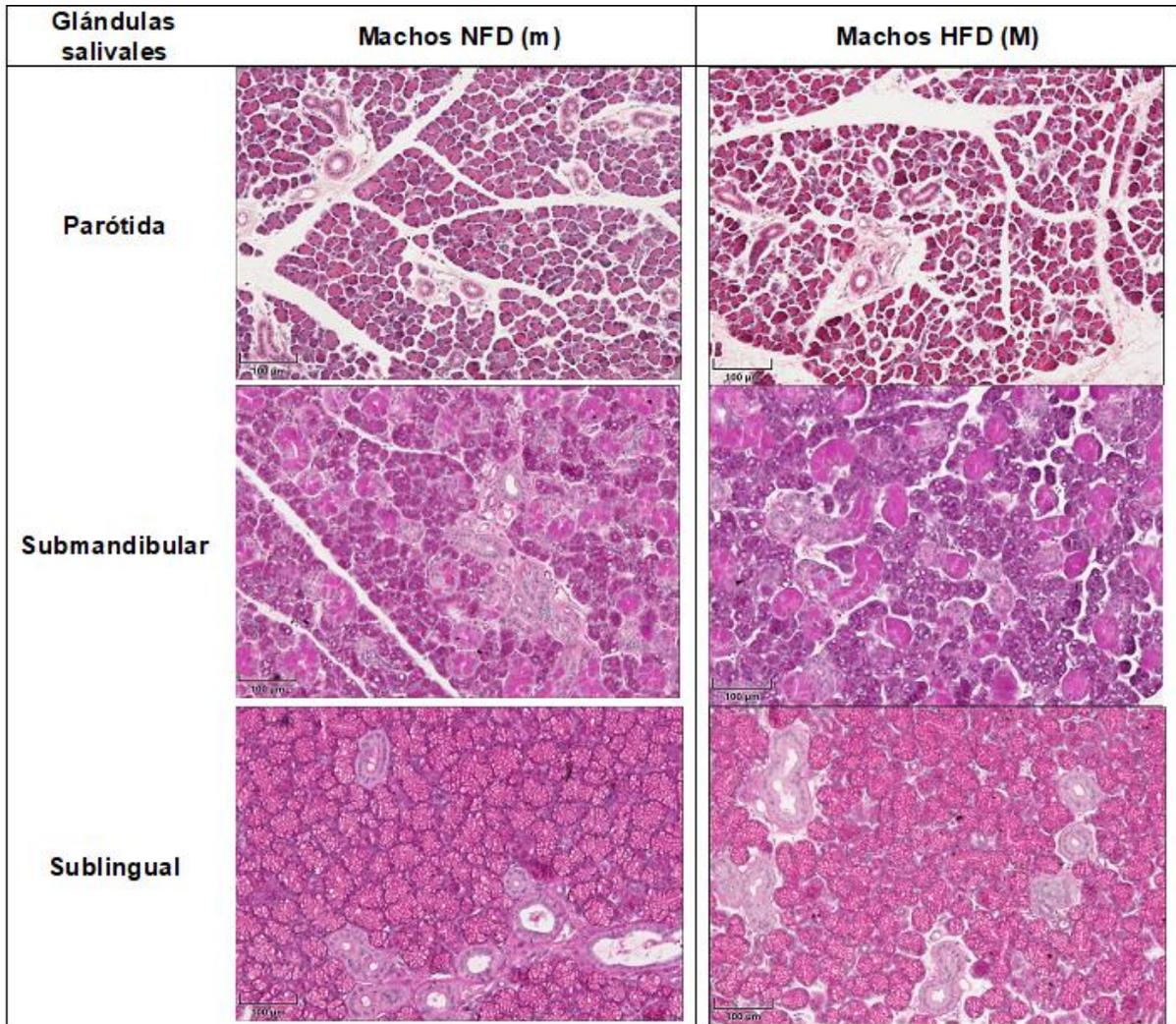
conformando abundantes acinos serosos y una cantidad menor de acinos mucosos, así como conductos formados por un epitelio cilíndrico simple (Panel 2).

9.2.5 Análisis histológico de las glándulas salivales sublinguales de ratas Wistar hembra y macho F0

Las glándulas salivales sublinguales de las hembras NFD (h), mostraron acinos mucosos conformados por células piramidales mucosas con un abundante citoplasma basófilo, núcleos basales y aplanados, así como un estroma de tejido conectivo que contiene el sistema de conductos de epitelio cilíndrico simple. Por su parte, las hembras HFD (H), presentaron una estructura histológica similar a las hembras control (h) (Panel 1). Sin embargo, de manera parecida a lo que sucedió en las glándulas salivares submandibulares, los machos presentan una mayor abundancia de vacuolas en el citoplasma de las células mucosas con respecto a lo observado en las hembras. Aunque entre los grupos de machos (M y m), no se registraron diferencias histológicas, ambos mostraron una estructura típica de tejido glandular sublingual (Panel 2).



Panel 1. Micrografías de las glándulas salivales mayores de ratas Wistar hembras F0. Se muestran reconstrucciones de los cortes histológicos de las glándulas: parótida, submandibular y sublingual de hembras NFD (h) y hembras HFD (H). Imágenes a 40X.



Panel 2. Micrografías de las glándulas salivales mayores de ratas Wistar machos F0. Se muestran reconstrucciones de los cortes histológicos de las glándulas: parótida, submandibular y sublingual de machos NFD (m) y machos HFD (M). Imágenes a 40X

9.3 Efecto intergeneracional de la obesidad parental

Siguiendo el enfoque DOHaD para estudiar el origen temprano de la obesidad y de las enfermedades relacionadas a esta condición, una vez que establecimos nuestro modelo de obesidad en ratas Wistar hembra y macho (F0), nos dimos a la tarea de obtener la progenie (F1). Lo anterior con el objetivo de evaluar el efecto intergeneracional de la obesidad materna y paterna sobre la somatometría, el metabolismo y la estructura histológica de las glándulas salivales mayores de las crías de la generación F0. Para ello, presentamos esta sección de resultados dividida en dos: **1)** Comparamos los efectos de la obesidad materna (**H**) en sus crías F1 hembra (Hh) y macho (Hm) contra los parámetros de las crías F1 hembra (hh) y macho (hm), gestadas en un matroambiente control (**h**) y **2)** Bajo la misma lógica, comparamos los efectos de la obesidad paterna (**M**) en sus crías F1 hembra (Mh) y macho (Mm) contra los parámetros de las crías F1 hembra (mh) y macho (mm), provenientes de padres control (**m**).

Después de analizar el conjunto de los resultados obtenidos para la generación F1, pudimos observar un efecto diferencial producto de la obesidad materna y paterna, que a su vez presentó diferencias dependiendo del sexo de las crías F1. La obesidad materna tuvo efectos en la somatometría y metabolismode la progenie masculina (Hm), que presento valores mayores en los parámetros de IMC y glucemia basal comparados con los machos de madres control (hm), mientras que la obesidad paterna tuvo efectos sobre la somatometría y la estructura histológica de las glándulas salivales mayores tanto en la progenie masculina (Mm) como femenina (Mh), ya que las crías de padres obesos (Mm y Mh), presentaron una reducción en la ganancia de peso comparados con sus respectivos grupos control (mh y mm), así como un aumento en tamaño de la glándula parótida.

9.3.1 Ganancia de peso corporal de la progenie F1 de ratas Wistar obesas (**H** y **M**)

Los resultados de la cinética de ganancia de peso de las crías F1, mostraron que la obesidad materna (H) no tuvo efectos significativos sobre el peso ni de la progenie femenina (Hh) ni de la masculina (Hm) con respecto a los grupos control (hh y hm). La única diferencia que se observó fue en la semana 11, dónde los machos de madres obesas (Hm) presentaron un porcentaje de peso significativamente menor al grupo control (fig. 12A), probablemente debido a un error humano de medición; ya que, al analizar la ganancia de peso total, observamos que no existieron diferencias estadísticas entre el peso corporal de las crías F1 hembras o machos gestadas en un matroambiente de obesidad y los grupos de madres con normopeso (fig. 12C).

Por el contrario, los resultados mostraron que la obesidad paterna (M) sí tuvo efectos significativos sobre la cinética de ganancia de peso de las crías F1. Para la progenie femenina observamos que a las 11, 14, 16, 17 y 18 semanas postnatales (SPN), las crías hembra de padres obesos (Mh) presentaron porcentajes de peso significativamente menores a las crías hembra de padres control (mh) (fig. 12B). Asimismo, en la progenie masculina observamos un comportamiento similar, donde las crías machos de padres obesos (Mm) a la edad de 6, 7, 9, 11, 14, 15, 17 y 18 SPN presentaron también porcentajes de peso significativamente menores con respecto al grupo de crías macho de padres control (mm) (fig. 12B). Al analizar la ganancia de peso total, los resultados indican que tanto la progenie femenina (Mh) como masculina (Mm) de padres obesos presentó una pérdida de peso significativa con respecto a la progenie control (mh y mm), en los machos (Mm) observamos un porcentaje de peso de 1005.4%, mientras que los machos control (mm), presentaron un porcentaje de peso de 1146.9%, lo que indica que la obesidad paterna promovió una pérdida de peso de 141.5%. Por su parte las hembras crías de padres obesos (Mh) presentaron un porcentaje de peso igual a 6.7.63%, mientras que las crías de padres control obtuvieron una ganancia de peso de 682.8%, es decir, 75.2% más que las crías de padres obesos (fig. 12D).

9.3.2 Efecto de la obesidad parental (H y M) de ratas Wistar sobre la somatometría de la progenie F1

La valoración de los parámetros somatométricos se realizó para todos los grupos cuando las ratas F1 alcanzaron las 18 spn, a esta edad obtuvimos la acumulación de tejido adiposo mediante la medida de la circunferencia abdominal (cm). Este parámetro no arrojó diferencias significativas en la progenie femenina (Hh) o masculina (Hm), derivada de la obesidad materna (Tabla 6) y tampoco se observaron diferencias estadísticas que indicarán algún cambio en el perímetro abdominal de las crías de padres obesos (Mh y Mm) (Tabla 7).

El análisis de la relación entre la talla y el peso corporal, es decir, el índice de masa corporal (IMC) alcanzado a las 18 spn, mostró que la obesidad materna (H) tuvo un efecto sobre el IMC de la progenie masculina, como se puede observar en la tabla 6, los machos hijos de madres obesas (Hm) presentaron un IMC de 0.78, valor que fue estadísticamente mayor (9% mayor) con respecto al IMC de 0.71 alcanzado por los machos hijos de madres control (hm), mientras que para la progenie femenina (Hh) no se encontraron diferencias con respecto al control (hh) (Tabla 6). En cambio, pudimos constatar que la obesidad paterna no mostró efectos sobre el cálculo del IMC ni de la progenie masculina (Mm) ni de la femenina (Mh), ya que se obtuvieron resultados estadísticamente similares a los grupos control (mm y mh) (Tabla 7).

9.3.3 Efecto de la obesidad parental (H y M) de ratas Wistar sobre la adiposidad de la progenie F1

Los resultados correspondientes a la acumulación de tejido adiposo corporal, muestran que la obesidad materna (H) no tuvo efectos sobre su progenie femenina (Hh) o masculina (Hm), ya que ambos grupos de crías presentaron porcentajes de adiposidad visceral (TAV), subcutánea (TASC) y adiposidad total (AT) estadísticamente similares a los porcentajes de tejido adiposo de la progenie femenina (hh) y masculina (hm) de madres control (fig. 13A). Siguiendo el mismo comportamiento, la obesidad paterna (M) tampoco mostró efectos en la acumulación de la adiposidad visceral (TAV), subcutánea (TASC) o total (AT) de la progenie femenina (Mh) o masculina (Mm), ya que los valores de estos grupos resultaron ser estadísticamente similares a los encontrados para la progenie femenina (mh) y masculina (mm) de padres control (fig. 13B).

Estos resultados nos indican que el efecto de la obesidad parental (H y M) no afectó la composición corporal de la progenie F1 en cuanto al porcentaje de tejido adiposo.

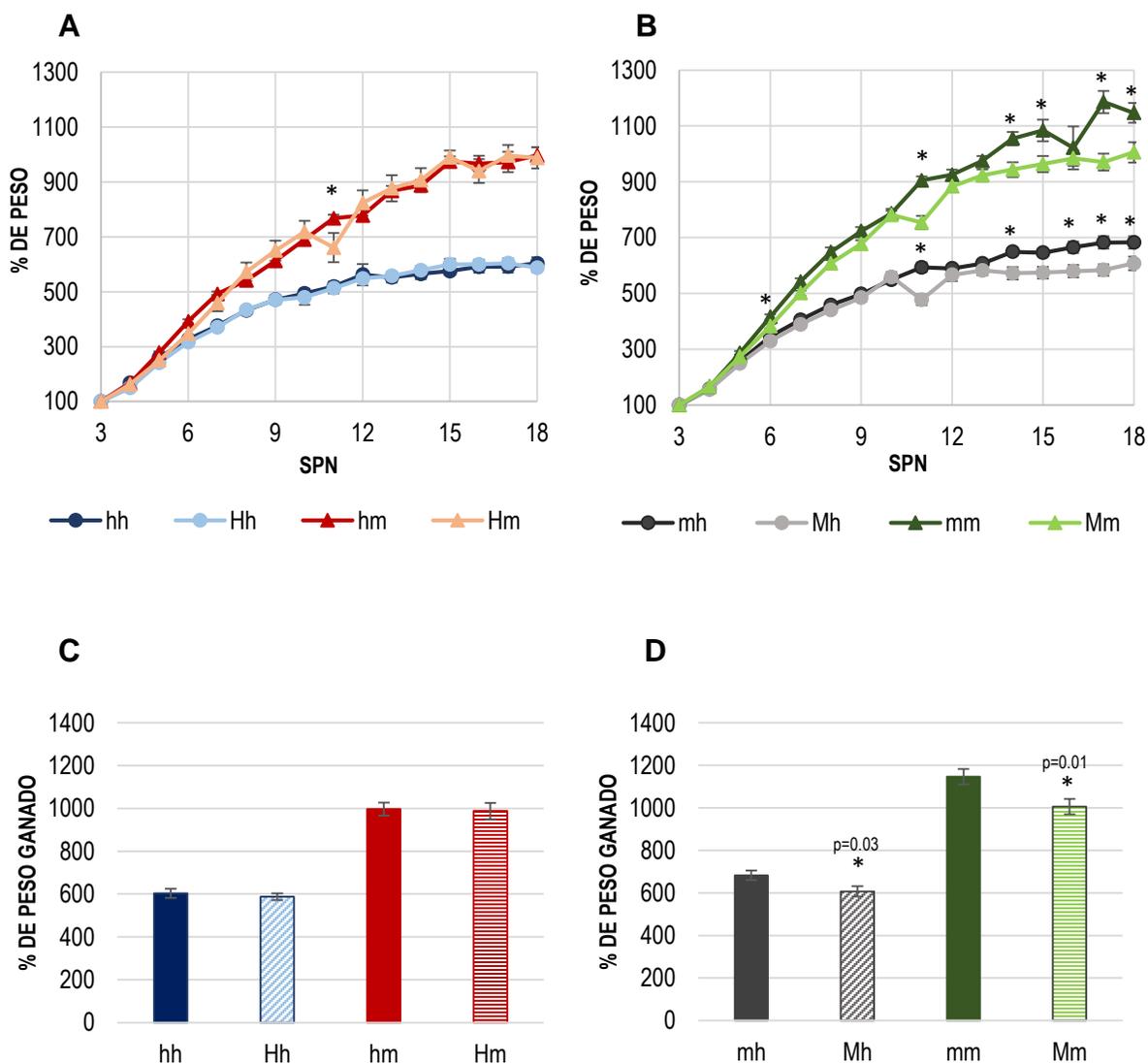


Figura 12. Ganancia de peso corporal en la progenie F1 de ratas Wistar obesas H y M. A) Efecto de la obesidad materna (H) sobre la ganancia de peso corporal en las crías hembra (Hh) y macho (Hm); **B)** Efecto de la obesidad paterna (M) sobre la ganancia de peso corporal en las crías hembra (Mh) y macho (Mm); **C)** Ganancia de peso corporal total en la progenie de madres obesas; **D)** Ganancia de peso corporal total en la progenie de padres obesos. Se muestran las gráficas de los promedios \pm SEM de cada parámetro. Se realizó una prueba de *t de student* para cada parámetro. El símbolo: (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p\text{-value} < 0.05$). **hh**: hembras hijas de madres en normopeso; **Hh**: hembras hijas de madres obesas; **hm**: machos hijos de madres en normopeso; **Hm**: machos hijos de madres obesas; **mh**: hembras hijas de padres en normopeso; **Mh**: hembras hijas de padres obesos; **mm**: machos hijos de padres en normopeso; **Mm**: machos hijos de padres obesos.

Tabla 6 Efecto intergeneracional de la obesidad materna (H) sobre las crías hembra y macho F1

Parámetro	hh	Hh	p-value	hm	Hm	p-value
Circunferencia abdominal (cm)	15.92 ± 0.82	16.3 ± 0.86	0.4	19.74 ± 0.71	20.33 ± 0.83	0.3
IMC $\left(\frac{g}{cm}\right)^2$	0.57 ± 0.02	0.59 ± 0.05	0.3	0.71 ± 0.05	0.78 ± 0.04	0.02*

Se muestran las medianas de cada variable ± la desviación cuartil de cada uno. Se realizó una prueba de *U de Wilcoxon-Mann-Whitney* para cada variable. El símbolo: (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre grupos (*p-value* < 0.05). **hh**: hembras hijas de madres en normopeso; **Hh**: hembras hijas de madres obesas; **hm**: machos hijos de madres en normopeso; **Hm**: machos hijos de madres obesas.

Tabla 7 Efecto intergeneracional de la obesidad paterna (M) sobre las crías hembra y macho F1

Parámetro	mh	Mh	p-value	mm	Mm	p-value
Circunferencia abdominal (cm)	15.92 ± 0.82	16.08 ± 0.66	0.7	19.74 ± 0.71	19.67 ± 0.61	0.8
IMC $\left(\frac{g}{cm}\right)^2$	0.57 ± 0.02	0.55 ± 0.02	0.1	0.71 ± 0.05	0.74 ± 0.04	0.1

Se muestran las medianas de cada variable ± la desviación cuartil de cada uno. Se realizó una prueba de *U de Wilcoxon-Mann-Whitney* para cada variable. El símbolo: (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre grupos (*p-value* < 0.05). **mh**: hembras hijas de padres en normopeso; **Mh**: hembras hijas de padres obesos; **mm**: machos hijos de padres en normopeso; **Mm**: machos hijos de padres obesos.

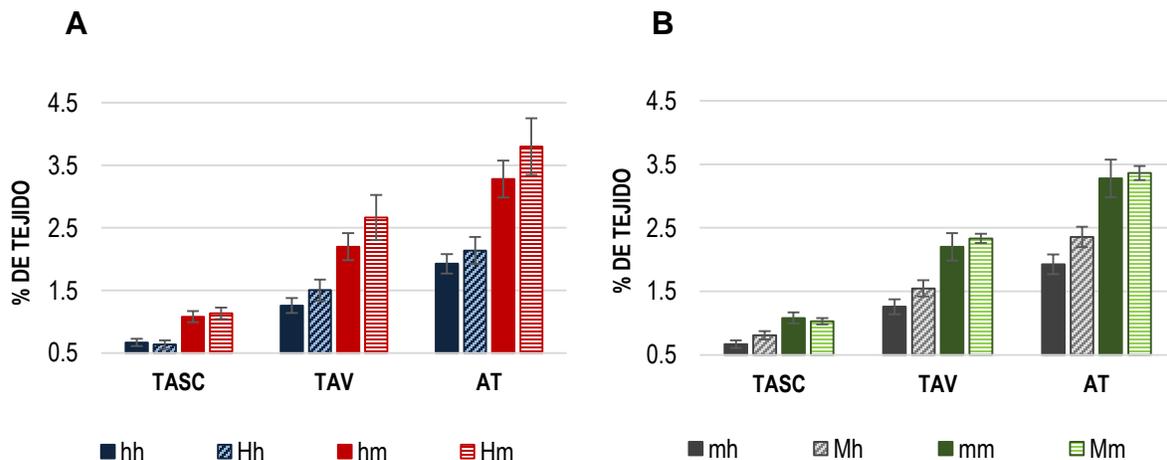


Figura 13. Efecto de la obesidad parental (H y M) de ratas Wistar sobre la adiposidad de la progenie F1. A) Cuantificación de la adiposidad en las crías hembra (Hh) y macho (Hm) de madres obesas B) Cuantificación de la adiposidad en las crías hembra (Mh) y macho (Mm) de padres obesos. Se realizó una prueba de *t de student* para cada parámetro. Se muestran las gráficas de los promedios ± SEM de los diferentes cojinetes adiposos y de la adiposidad total ganada a las 18 semanas postnatales. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos. **TASC**: tejido adiposo subcutáneo; **TAV**: tejido adiposo visceral; **AT**: adiposidad total; **hh**: hembras hijas de madres en normopeso; **Hh**: hembras hijas de madres obesas; **hm**: machos hijos de madres en normopeso; **Hm**: machos hijos de madres obesas; **mh**: hembras hijas de padres en normopeso; **Mh**: hembras hijas de padres obesos; **mm**: machos hijos de padres en normopeso; **Mm**: machos hijos de padres obesos.

9.3.4 Análisis bioquímico de plasma sanguíneo en la progenie F1 de ratas Wistar obesas (H y M)

En el análisis bioquímico de los plasmas sanguíneos de la generación F1, observamos que la glucemia basal se vio alterada por la obesidad materna en la progenie masculina (Hm), ya que los machos hijos de madres obesas presentaron valores de glucosa en ayuno de 88.5 mg/dl comparados con los 83.1 mg/dl del grupo control (hm), es decir 5,4 mg/dl de glucosa por encima del promedio control, lo que equivale a un aumento del 6.5%. Por su parte, este parámetro no se vio afectado en la progenie femenina, ya que las hembras hijas de madres obesas (Hh) y las hembras hijas de madres control (hh) presentaron valores de glucosa basal estadísticamente similares (Tabla 8). Contrario a lo encontrado para la obesidad materna, el efecto de la obesidad paterna no alteró los niveles de glucemia ni de la progenie masculina (Mm) ni de la femenina (Mh), ya que ambos grupos presentaron valores de glucosa basal estadísticamente similares a sus grupos control (mm y mh) (Tabla 9).

Finalmente, medimos los niveles de insulina plasmática, y observamos que los niveles de esta hormona no se vieron afectados por la obesidad materna (Tabla 8) o paterna (Tabla 9), ya que en ambas situaciones la progenie mantuvo valores de insulina plasmática estadísticamente similares al de la progenie de los grupos control.

9.3.5 Análisis metabólico de la progenie F1 de ratas Wistar obesas (H y M)

Para evaluar el efecto metabólico intergeneracional de la obesidad parental, realizamos una prueba de tolerancia a la glucosa y una de sensibilidad a la insulina. Los resultados de la primera prueba, muestran que la obesidad materna (H) no tuvo efectos adversos sobre el metabolismo de la glucosa de las crías hembra (Hh) de la generación F1, ya que como podemos observar en la figura 12, tanto la cinética de respuesta al estímulo de glucosa exógeno (fig.14A) como la evaluación del área bajo la curva de esta cinética (fig. 14C), no arrojaron diferencias significativas con respecto al grupo control (hh). Mientras que, al observar el comportamiento de la progenie masculina de estas mismas madres obesas (Hm), los porcentajes de glucosa en sangre fueron significativamente mayores al grupo control (hm) en los tiempos 15, 90 y 120 minutos luego del estímulo exógeno de glucosa (fig. 14B). Este resultado se ve reflejado al calcular el área bajo la curva, donde los machos hijos de madres obesas (Hm) presentan un AUG de 21973.63, área que fue 23% mayor con respecto a los machos hijos de madres en normopeso (hm), quienes presentaron un AUG promedio de 17803.42 (fig. 12C). Llama la atención, que los

resultados que encontramos sobre el efecto de la obesidad materna (H) con respecto a la tolerancia a la glucosa, es similar a los efectos observados para la obesidad paterna (M). Es decir, la progenie femenina (Mh) no presenta diferencias estadísticas ni en la cinética de respuesta al estímulo de glucosa (fig. 15A) y tampoco en el área bajo la curva (fig. 15C) con respecto al grupo control (mh). Interesantemente, la progenie masculina de machos obesos (Mm) sí presenta alteraciones en la cinética de tolerancia a la glucosa en los tiempos 15, 30 y 120 minutos después del estímulo, ya que los porcentajes de estos machos F1 fueron mayores a los porcentajes alcanzados por los machos de padres control (mm) (fig. 15B). Por supuesto, esta alteración también se ve reflejada en la evaluación del área bajo la curva, donde los machos hijos de padres obesos (Mm) presentan un área significativamente mayor con respecto a los machos hijos de padres en normopeso (mm), ya que el AUG de los hijos de obesos presento un valor de 21424.26, mientras que los machos hijos de padres con normopeso, obtuvieron un promedio de AUG igual a 17803.42, esto es una diferencia del 20.3% (fig. 15C).

En cuanto a los resultados de las cinéticas de sensibilidad a la insulina, pudimos observar que ni la obesidad materna (H) ni la paterna (M) mostraron alteraciones en el metabolismo de la insulina de su progenie (F1), ya que tanto las hembras como los machos hijos de madres (Hh, Hm) o padres (Mh, Mm) obesos, presentaron cinéticas de resistencia a la insulina con valores de glucosa estadísticamente similares a la progenie de madres y padres control, (fig. 16A, 16B y 17A, 17B). Asimismo, las cuantificaciones de las áreas bajo las curvas de las cinéticas de sensibilidad a la insulina fueron estadísticamente similares entre grupos (fig. 16C). Por lo tanto, los datos no muestran alteraciones en el metabolismo de la insulina.

Tabla 8. Efecto de la obesidad materna (H) de ratas Wistar en los indicadores bioquímicos del plasma sanguíneo de la progenie F1

Indicador bioquímico	hh	Hh	<i>p-value</i>	hm	Hm	<i>p-value</i>
Glucemia basal (mg/dL)	82.5 ± 4.04	87.67 ± 11.4	0.33	83.1 ± 9.01	88.5 ± 2.88	0.049*
Insulina (µg/ml)	0.16 ± 0.01	0.72 ± 0.53	0.16	0.79 ± 0.63	2.7 ± 1.87	0.12

Se muestran los promedios de cada variable ± la desviación estándar de cada una. Se realizó una prueba de *t de Student* para cada variable. El símbolo: (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p\text{-value} < 0.05$). **hh**: hembras hijas de madres en normopeso; **Hh**: hembras hijas de madres obesas; **hm**: machos hijos de madres en normopeso **Hm**: machos hijos de madres obesas.

Tabla 9. Efecto de la obesidad paterna (M) de ratas Wistar en los indicadores bioquímicos del plasma sanguíneo de la progenie F1

Indicador bioquímico	mh	Mh	<i>p-value</i>	mm	Mm	<i>p-value</i>
Glucemia basal (mg/dL)	82.5 ± 4.04	80 ± 5.18	0.37	83.1 ± 9.01	82.3 ± 3.72	0.674
Insulina (µg/ml)	0.71 ± 0.58	0.32 ± 0.24	0.54	0.68 ± 0.45	0.40 ± 0.16	0.38

Se muestran los promedios de cada variable ± la desviación estándar de cada una. Se realizó una prueba de *t de Student* para cada variable. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p\text{-value} < 0.05$). **mh**: hembras hijas de padres en normopeso; **Mh**: hembras hijas de padres obesos; **mm**: machos hijos de padres en normopeso; **Mm**: machos hijos de padres obesos.

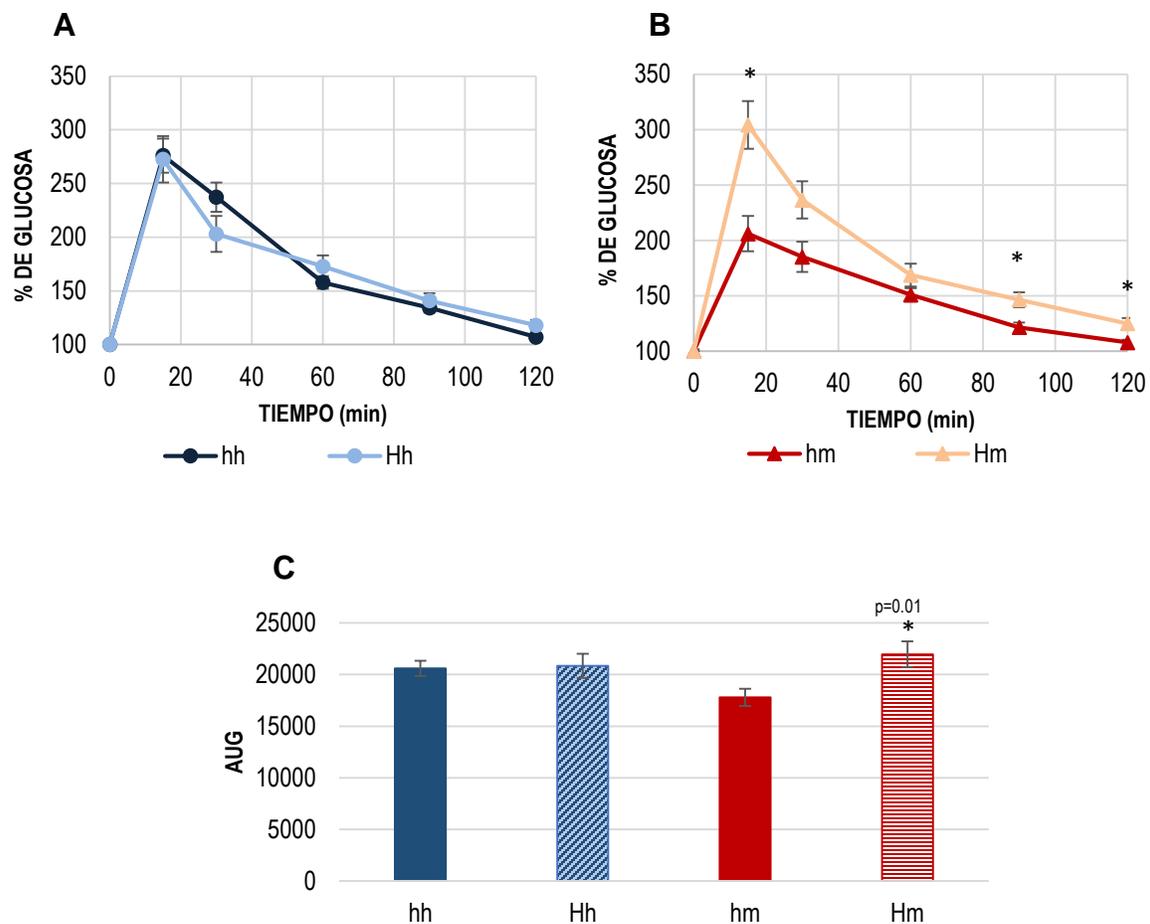


Figura 14. Efecto de la obesidad materna (H) de ratas Wistar sobre la tolerancia a la glucosa de la progenie F1. A) Cinética de tolerancia a la glucosa en las crías hembra de madres en normopeso (hh) y madres obesas (Hh); **B)** Cinética de tolerancia a la glucosa en las crías macho de madres en normopeso (hm) y madres obesas (Hm); **C)** Cuantificación del área bajo la curva (AUG) correspondiente a las cinéticas de tolerancia a glucosa en la progenie F1 femenina (hh y Hh) y masculina (hm y Hm). Se muestran los promedios \pm SEM de cada parámetro. Se realizó una prueba de *t de student* para cada punto temporal y para la comparación entre las áreas bajo la curva. El símbolo: (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p\text{-value}<0.05$). **hh**: hembras hijas de madres en normopeso; **Hh**: hembras hijas de madres obesas; **hm**: machos hijos de madres en normopeso; **Hm**: machos hijos de madres obesas.

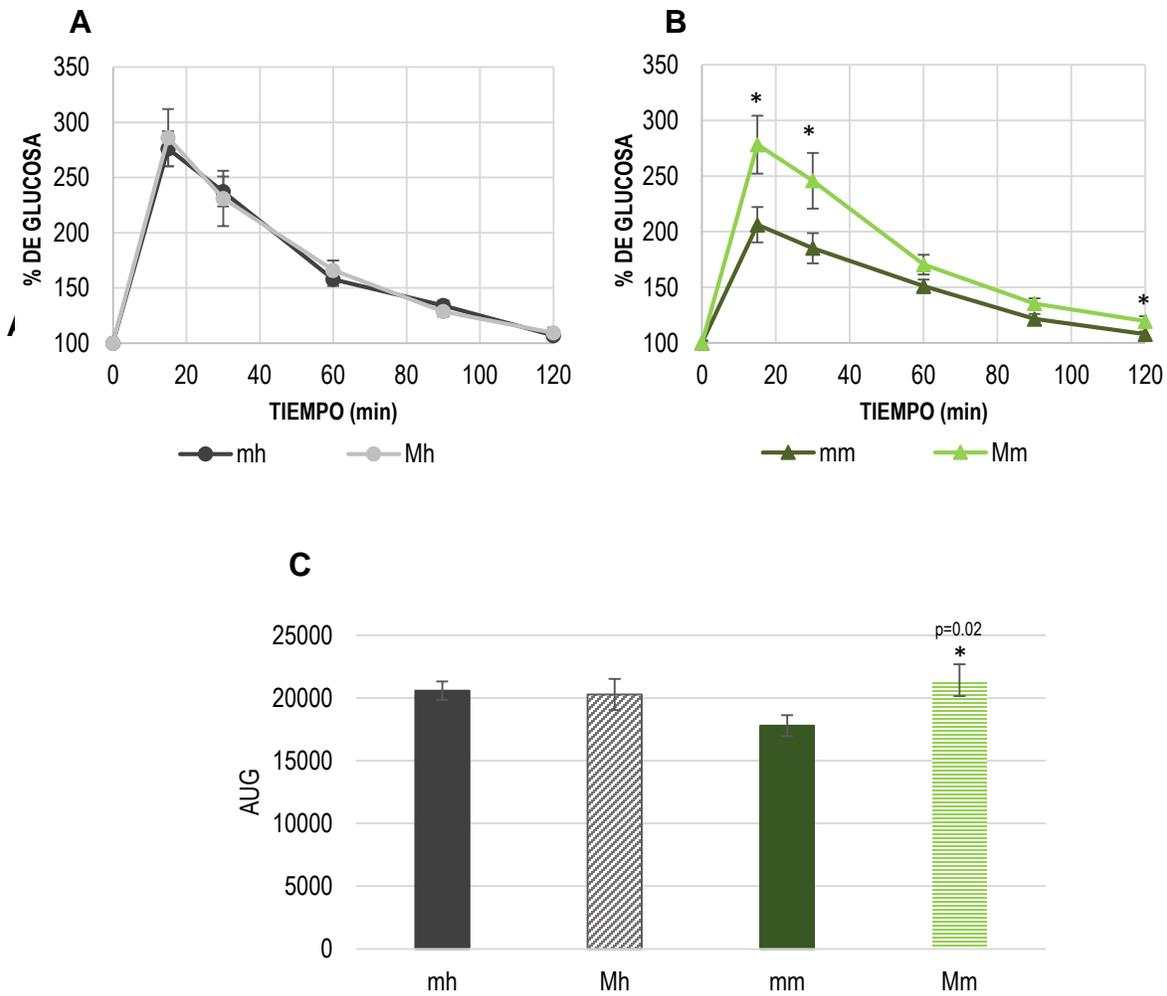


Figura 15. Efecto de la obesidad paterna (M) de ratas Wistar sobre la tolerancia a la glucosa de la progenie F1. A) Cinética de tolerancia a la glucosa en las crías hembra de padres en normopeso (mh) y padres obesos (Mh); **B)** Cinética de tolerancia a la glucosa en las crías macho de padres en normopeso (mm) y padres obesos (Mm); **C)** Cuantificación del área bajo la curva (AUC) correspondiente a las cinéticas de tolerancia a glucosa en la progenie F1 femenina (mh y Mh) y masculina (mm y Mm). Se muestran los promedios \pm SEM de cada parámetro. Se realizó una prueba de *t de student* para cada punto temporal y para la comparación entre áreas bajo la curva. El símbolo: (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre grupos (p -value<0.05). **mh**: hembras hijas de padres en normopeso; **Mh**: hembras hijas de padres obesos; **mm**: machos hijos de padres en normopeso; **Mm**: machos hijos de padres obesos.

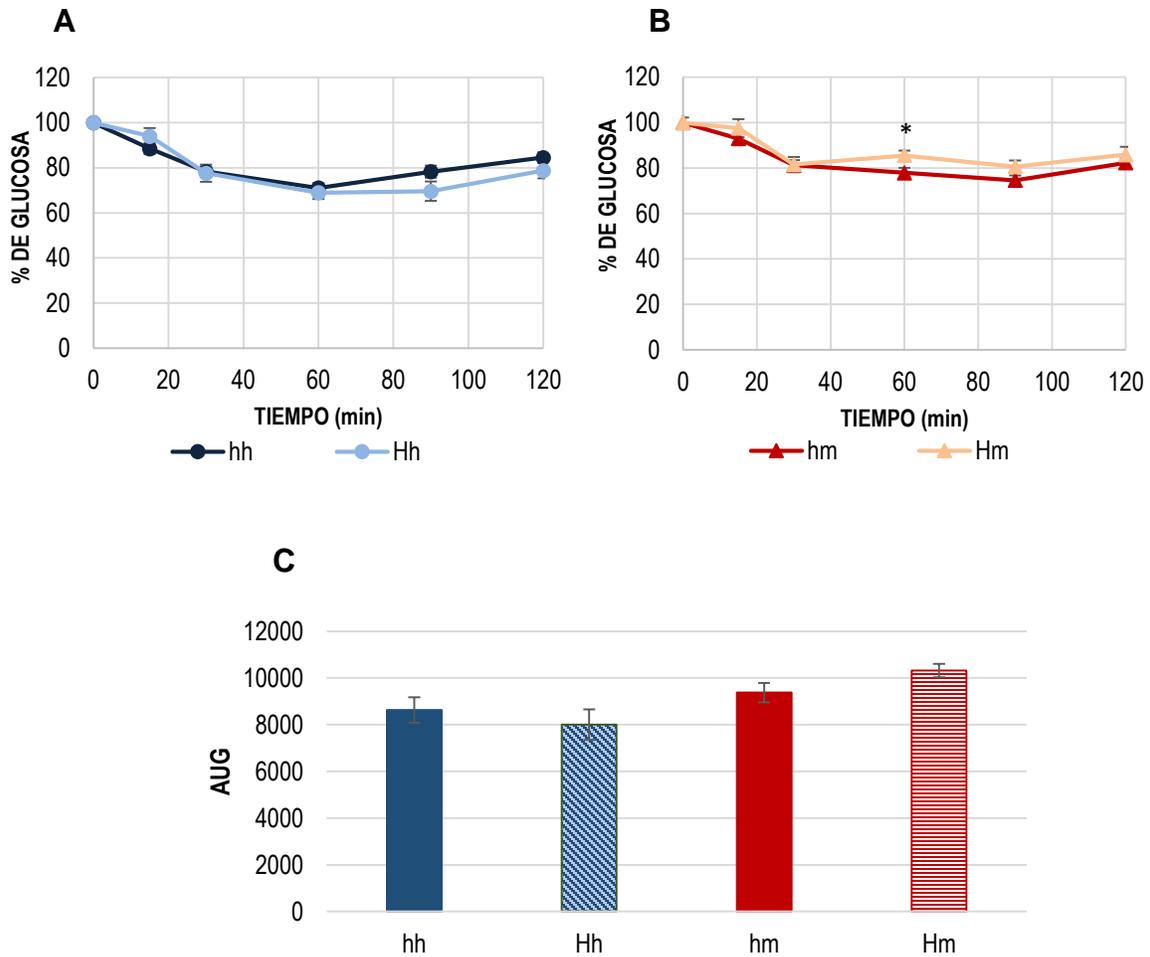


Figura 16. Efecto de la obesidad materna (H) de ratas Wistar sobre la sensibilidad a la insulina de la progenie F1. A) Cinética de resistencia a la insulina en las crías hembra de madres obesas (Hh); **B)** Cinética de resistencia a la insulina en las crías macho de madres obesas (Hm); **C)** Cálculo del área bajo la curva (AUC) correspondiente a la resistencia a insulina en la progenie femenina y masculina de madres obesas (Hh y Hm) y madres en normopeso (hh y hm). Se muestran los promedios \pm SEM de cada parámetro. Se realizó una prueba de *t de student* para cada punto temporal y para la comparación entre áreas bajo la curva. El símbolo: (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p\text{-value}<0.05$). **hh**: hembras hijas de madres en normopeso; **Hh**: hembras hijas de madres obesas; **hm**: machos hijos de madres en normopeso; **Hm**: machos hijos de madres obesas.

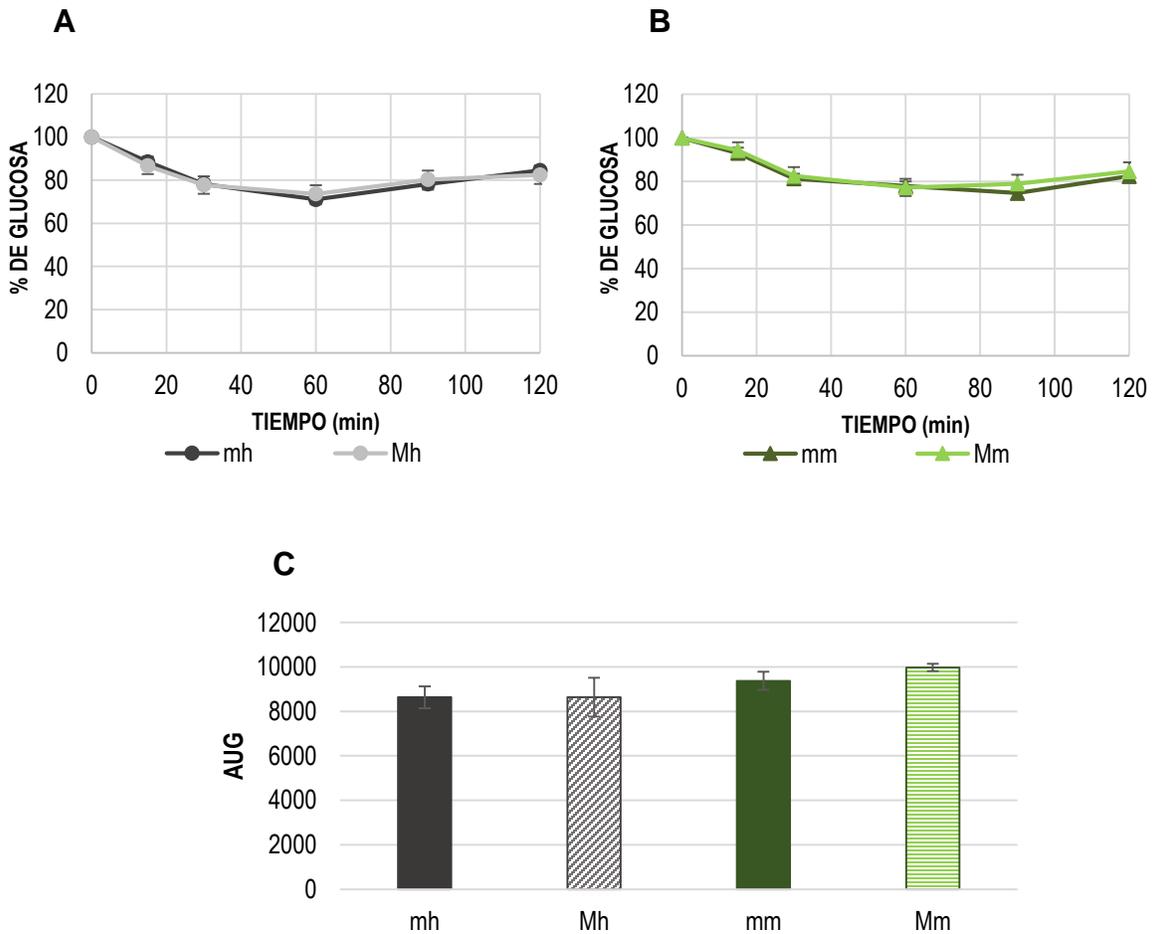


Figura 17. Efecto de la obesidad paterna (M) de ratas Wistar sobre la sensibilidad a la insulina de la progenie F1. A) Cinética de resistencia a la insulina en las crías hembras de padres obesos (Mh); **B)** Cinética de resistencia a la insulina en crías macho de padres obesos (Mm); **C)** Cálculo del área bajo la curva (AUC) correspondiente a la resistencia a insulina en la progenie femenina y masculina de padres obesos (Mh y Mm) y padres en normopeso (mh y mm). Se muestran los promedios \pm SEM de cada parámetro. Se realizó una prueba de *t de student* para cada punto temporal y para la comparación entre áreas bajo la curva. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos (p -value>0.05). **mh**: hembras hijas de padres en normopeso; **Mh**: hembras hijas de padres obesos; **mm**: machos hijos de padres en normopeso; **Mm**: machos hijos de padres obesos

9.4 Efecto de la obesidad parental sobre el peso y la histología de las glándulas salivales mayores de la progenie F1

Después de analizar el efecto de la obesidad materna y paterna sobre los parámetros somatométricos y metabólicos de la generación F1, evaluamos el efecto de la obesidad parental sobre el peso de las glándulas salivales mayores y el número de acinos en cada una. Los resultados de nuestras observaciones volvieron a comportarse con un fenómeno de dimorfismo sexual, ya que, aunque la obesidad materna (H) no afectó de forma significativa ni el peso ni el número de acinos de las glándulas salivales de la progenie (Hh y Hm), detectamos que la obesidad paterna (M) altera de forma significativa el número de acinos serosos de la glándula parótida.

9.4.1 Análisis del efecto de la obesidad parental (H y M) sobre la glándula salival parótida de la progenie F1.

Los resultados de la evaluación de la glándula parótida mostraron que la obesidad materna (H) no tuvo un impacto significativo sobre el peso de este órgano, ya que la progenie femenina (Hh) y masculina (Hm) de madres obesas presentaron proporciones de tejido estadísticamente similares a las de la progenie de madres control (hh y hm) (fig. 18A). De la misma manera, no encontramos diferencias estadísticas entre la cuantificación de los acinos serosos que componen la glándula salival parótida de la progenie de madres obesas (Hh y Hm) con respecto a la progenie de las madres en normopeso (hh y hm) (fig. 18C).

En cambio, la obesidad paterna (M) reflejó diferencias en el peso de la glándula parótida. En las crías hembras (Mh), se observó que el porcentaje corporal del peso de las glándulas parótidas fue de 0.4%, mientras que para las crías hembras de padres con normopeso fue de 0.29%, indicando que las glándulas parótidas de las crías hembra de obesos son en promedio un 0.11% más pesadas. Asimismo, los hijos de padres obesos (Mm), presentaron tamaños significativamente mayores en esta glándula con respecto a las crías macho (mm) de padres en normopeso (fig. 18B). De la misma forma que sucedió con las hembras (Mh y mh), los machos hijos de padres obesos (Mm) presentaron un porcentaje de glándula parótida de 0.33%, en promedio un 0.11% más pesadas que los hijos de padres con normopeso, ya que estos últimos presentaron un porcentaje de 0.22%. Sin embargo, al analizar la cuantificación de los acinos serosos, encontramos que únicamente la progenie femenina de padres obesos (Mh) presentó un número significativamente mayor con respecto al grupo control (mh). Las hembras hijas de padres obesos (Mh) obtuvieron 563.7 acinos serosos por campo, mientras que las hembras hijas de padres con normopeso (mh) obtuvieron 455.4 acinos serosos por campo, es decir, las hijas de

obesos (Mh) tenían 23.7% más acinos que las hijas de padres con normopeso (mh). Contrario a este resultado, la progenie masculina (Mm) arrojó un número estadísticamente similar de acinos con respecto al grupo control (mm) (fig. 18D)

9.4.2 Análisis del efecto de la obesidad parental (H y M) sobre el paquete glandular submandibular-sublingual de la progenie F1.

El paquete glandular submandibular-sublingual tanto en la progenie masculina (Hm) como femenina (Hh) de madres obesas, no presenta diferencias en el porcentaje de tejido con respecto a la progenie masculina (hm) o femenina (hh) de madres con normopeso (fig. 19A). Por su parte, la descendencia de padres obesos, tanto machos (Mm) como hembras (Mh), tampoco presenta diferencias significativas en el porcentaje de tejido que compone al paquete submandibular-sublingual cuando lo comparamos con el porcentaje que obtuvieron las crías machos (mm) y hembra (mh) de padres con normopeso (fig. 19B). Asimismo, al analizar el número de acinos en cada una de estas glándulas, observamos que no hubo diferencias en el número de acinos serosos o mucosos de la glándula submandibular entre los descendientes de madres obesas (Hh y Hm) o padres obesos (Mh y Mm) con respecto a los descendientes de madres con normopeso (hh y hm) o padres con normopeso (mh y mm), respectivamente (fig. 19C y D). Este mismo fenómeno fue observado en la cuantificación de acinos mucosos de la glándula sublingual, donde las crías hembra (Hh) y macho (Hm) de madres obesas presentaron una cantidad de acinos mucosos por campo estadísticamente similar al número de acinos mucosos cuantificados para las crías hembra (hh) y macho (hm) de madres con normopeso (fig.19E). Por su parte la descendencia femenina (Mh) y masculina (Mm) de padres obesos, también presentó un número estadísticamente similar de acinos mucosos de la glándula sublingual similar al número de acinos mucosos encontrado para la descendencia femenina (mh) y masculina (mm) de padres con normopeso (fig. 19F).

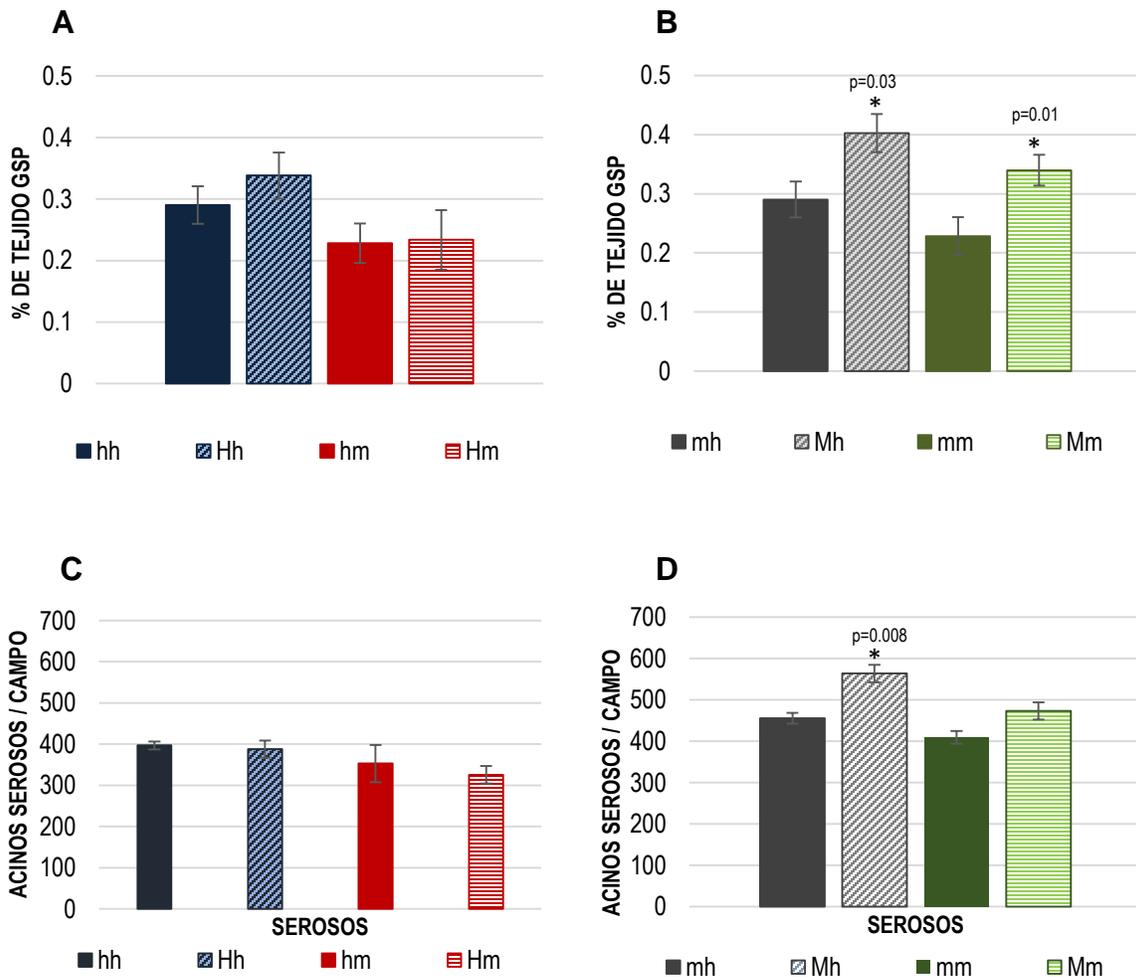


Figura 18. Efecto de la obesidad parental sobre la glándula salival parótida de la progenie F1 de ratas Wistar. **A)** Porcentaje de peso de la glándula parótida en las crías hembra (Hh) y macho (Hm) de madres obesas; **B)** Porcentaje de peso de la glándula parótida en las crías hembra (Mh) y macho (Mm) de padres obesos; **C)** Cuantificación de los acinos serosos de la glándula parótida de la progenie (Hh y Hm) de madres obesas; **D)** Cuantificación de los acinos serosos de la glándula parótida de la progenie (Mh y Mm) de padres obesos. Se muestran los promedios \pm SEM de cada parámetro. Se realizó una prueba de *t de student* para cada variable. El símbolo: (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p\text{-value}<0.05$). **hh**: hembras hijas de madres en normopeso; **Hh**: hembras hijas de madres obesas; **hm**: machos hijos de madres en normopeso; **Hm**: machos hijos de madres obesas; **mh**: hembras hijas de padres en normopeso; **Mh**: hembras hijas de padres obesos; **mm**: machos hijos de padres en normopeso; **Mm**: machos hijos de padres obesos.

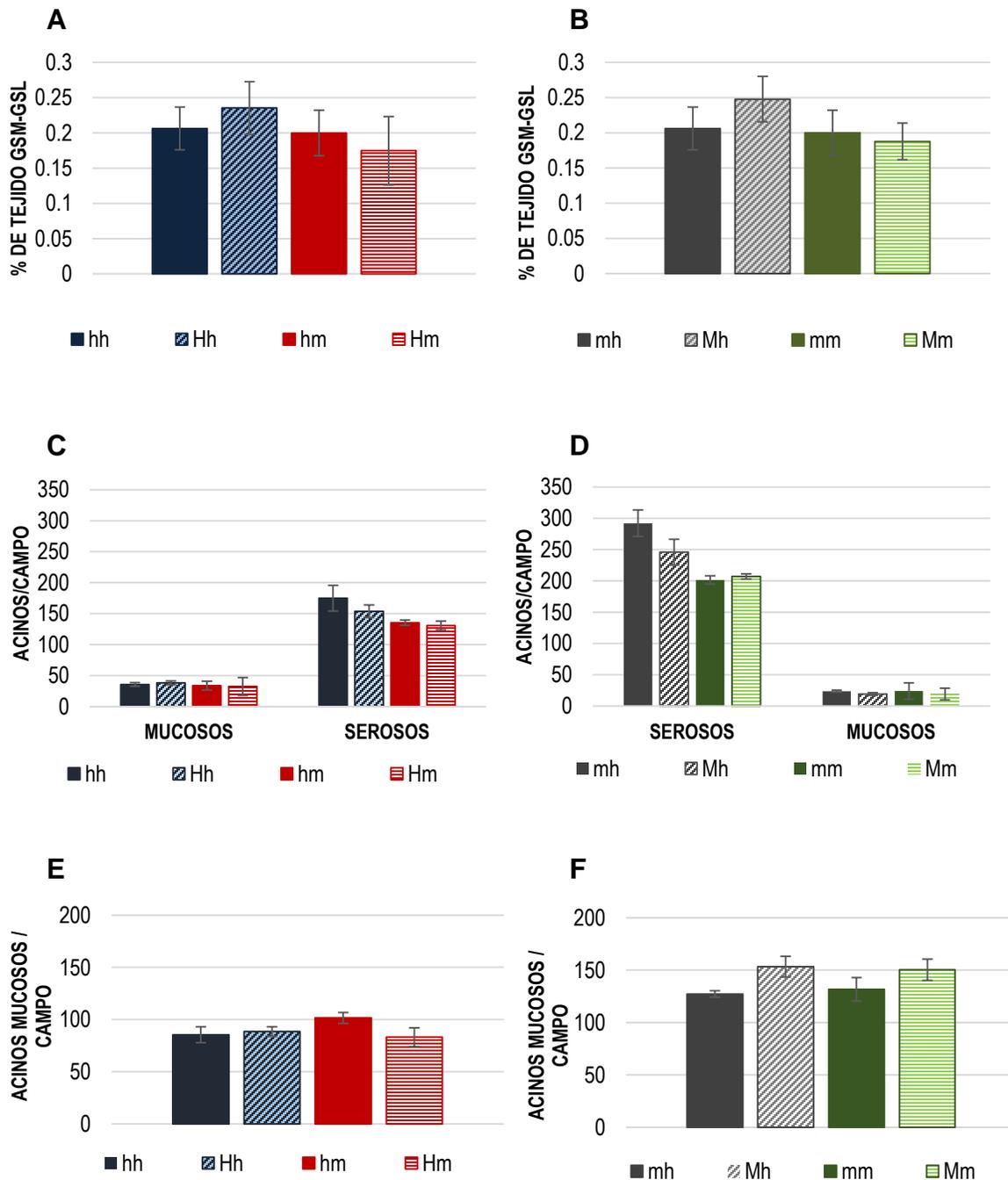


Figura 19. Efecto de la obesidad parental sobre el paquete de glándulas submandibular-sublingual de la progenie F1 de ratas Wistar. **A)** Porcentaje de peso del paquete de glándulas submandibular-sublingual en las crías hembra (Hh) y macho (Hm) de madres obesas; **B)** Porcentaje de peso del paquete de glándulas submandibular-sublingual en las crías hembra (Mh) y macho (Mm) de padres obesas; **C)** Cuantificación de acinos en la glándula submandibular de la progenie (Hh y Hm) de madres obesas; **D)** Cuantificación de acinos en la glándula submandibular de la progenie (Mh y Mm) de padres obesos; **E)** Cuantificación de acinos en la glándula sublingual en la progenie (Hh y Hm) de madres obesas; **F)** Cuantificación de acinos en la glándula sublingual en la progenie (Mh y Mm) de padres obesos. Se muestran los promedios \pm SEM de cada parámetro. Se realizó una prueba de *t de student* para cada variable. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas con $p\text{-value} > 0.05$. **hh**: hembras hijas de madres en normopeso; **Hh**: hembras hijas de madres obesas; **hm**: machos hijos de madres en normopeso; **Hm**: machos hijos de madres obesas; **mh**: hembras hijas de padres en normopeso; **Mh**: hembras hijas de padres obesos; **mm**: machos hijos de padres en normopeso; **Mm**: machos hijos de padres obesos.

9.4.3 Análisis histológico de las glándulas salivales mayores de la progenie F1 de ratas Wistar obesas (H y M)

a) Glándula parótida

En cuanto al efecto de la obesidad parental sobre la estructura histológica de las glándulas parótidas, observamos que la obesidad paterna promovió un aumento en el número de acinos serosos de estas glándulas tanto en su progenie femenina (Mh) como masculina (mm) con respecto a los grupos control (mh y mm). Sin embargo, la arquitectura histológica de las glándulas parótidas sólo presentó diferencias entre las hembras (Mh y mh), debido a que en las hijas de padres obesos observamos una mayor cantidad de vacuolas citoplasmáticas en las células piramidales de los acinos serosos (Panel 3). Estos hallazgos se comparten con el resultado de la cuantificación de acinos entre machos F0 (M y m), donde los machos HFD (M) presentan un número de acinos mayor a los machos NFD (m).

Por su parte, la obesidad materna no afectó la estructura histológica de las glándulas salivales parótidas ni en la progenie masculina (Hm) ni en la progenie femenina (Hh), ya que ambos grupos presentaron una estructura histológica similar a los grupos de crías macho y hembra de madres con normopeso (hm y hh) (Panel 4), las glándulas parótida se caracterizaron por presentar acinos serosos con células piramidales de núcleos basales, estroma de tejido conectivo con conductos de epitelio cilíndrico simple de la misma forma que se observó para las hembras F0 (H y h).

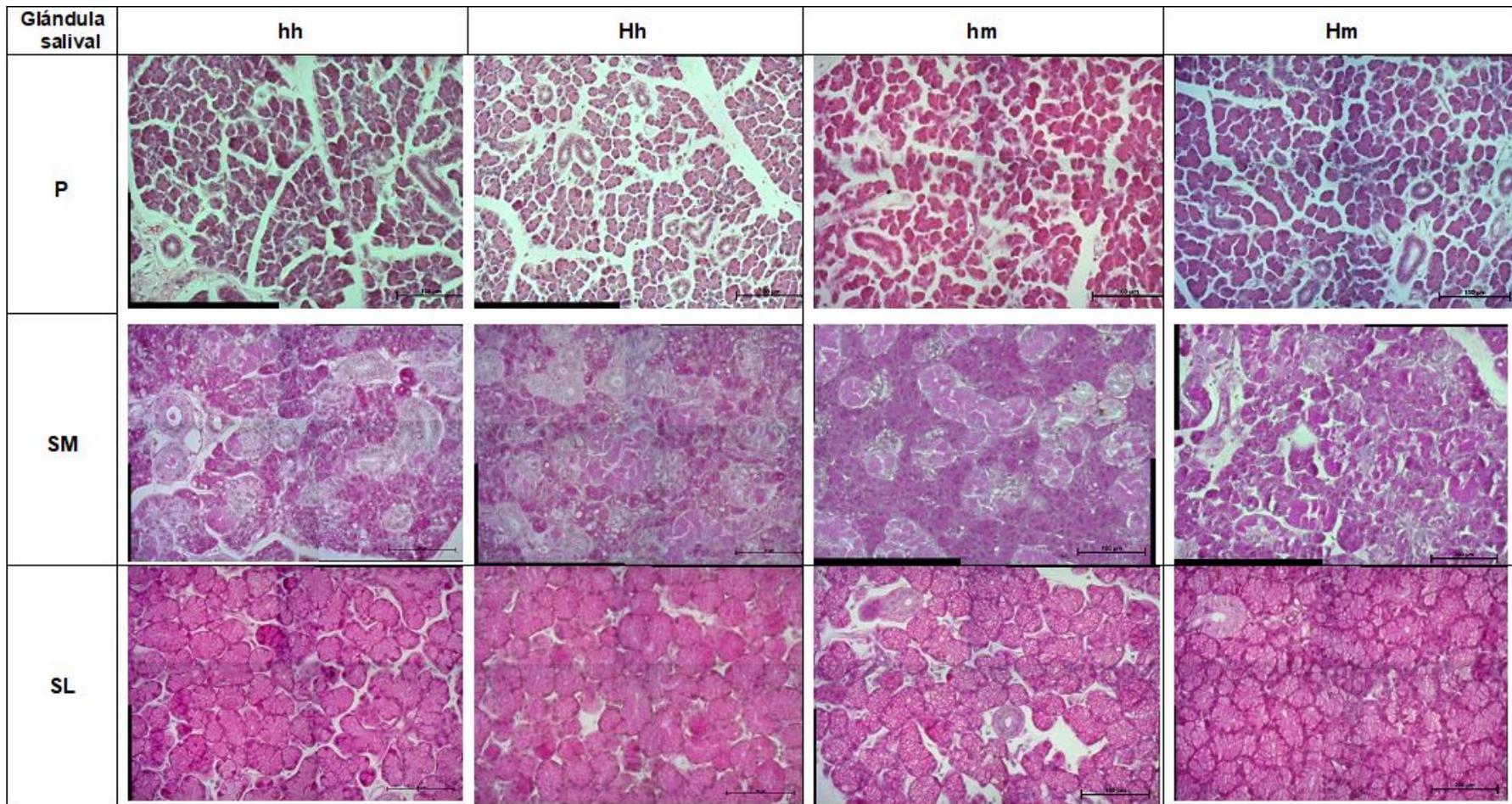
b) Glándula submandibular

Contrario a lo encontrado en hembras F0 (H y h), donde las hembras HFD (H) presentaron una disminución en el número de acinos mucosas, la arquitectura histológica de las glándulas submandibulares de la progenie masculina o femenina de madres obesas (Hm y Hh), no presentó diferencias con respecto a sus grupos control (hm y hh). Asimismo, la obesidad paterna tampoco generó alguna alteración en la estructura histológica de estas glándulas para su progenie femenina o masculina (Mh y Mm), manteniendo una arquitectura histológica típica, tal como se describió para los machos F0 (M y m).

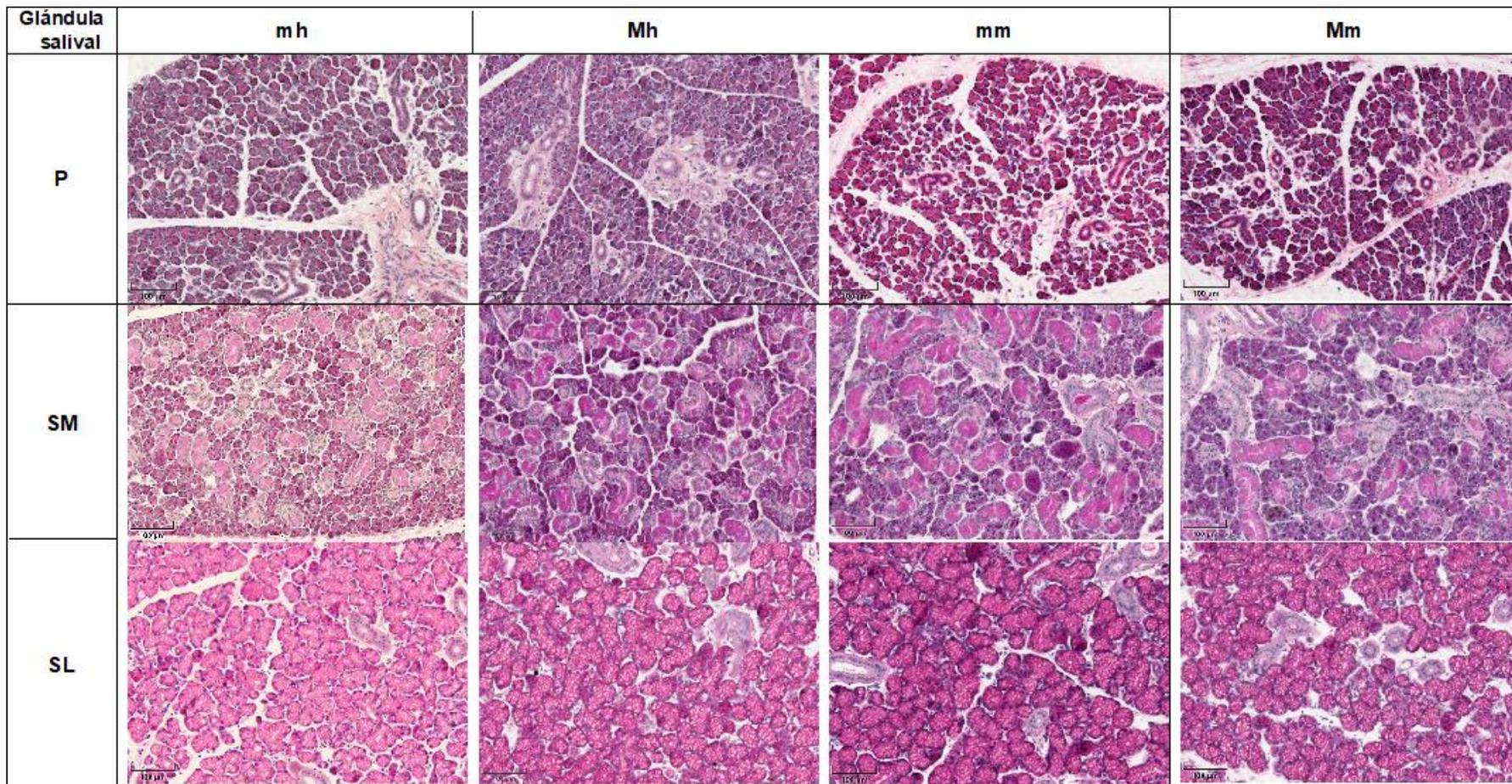
c) Glándula sublingual

Las glándulas sublinguales no presentaron alteraciones histológicas a causa de la obesidad parental (materna o paterna), ni en la progenie femenina (Hh y Mh), ni en la progenie masculina (Hm y Mm), ya que no observamos diferencias histológicas en estos grupos

comparados con la progenie femenina o masculina de madres y padres con normopeso (hh y hm; mh y mm). Estas glándulas presentaron una histología típica con acinos mucosos conformados por células piramidales de abundante citoplasma, núcleos basales y aplanados, así como un estroma de tejido conectivo con un sistema de conductos de epitelio cilíndrico simple tal como se describe para la generación de ratas F0.



Panel 3. Micrografías de las glándulas salivales mayores de la progenie F1 ratas Wistar hembras F0 (h y H). Se muestran reconstrucciones de los cortes histológicos de las glándulas: parótida, submandibular y sublingual de hembras y machos. **hh**: hembras hijas de madres en normopeso; **Hh**: hembras hijas de madres obesas; **hm**: machos hijos de madres en normopeso; **Hm**: machos hijos de madres obesas. Imágenes a 40X.



Panel 4. Micrografías de las glándulas salivales mayores de la progenie F1 ratas Wistar machos F0 (m y M). Se muestran reconstrucciones de los cortes histológicos de las glándulas: parótida, submandibular y sublingual de hembras y machos. **mh**: hembras hijas de padres en normopeso; **Mh**: hembras hijas de padres obesos; **mm**: machos hijos de padres en normopeso; **Mm**: machos hijos de padres obesos. Imágenes a 40X

X DISCUSIÓN

La obesidad se define como una patología caracterizada por la acumulación anormal o excesiva de grasa corporal que promueve un desajuste en el funcionamiento del tejido adiposo y el metabolismo, desencadenando así condiciones adversas para la preservación de la salud (OMS 2021 & Bays, et al. 2020). El estudio de las implicaciones que tiene esta enfermedad sobre diferentes tejidos y el desarrollo de patologías asociadas, ha llevado a la generación de modelos animales enfocados al estudio de la obesidad y/o sus efectos. El objetivo principal de esta investigación fue determinar el efecto que tiene la obesidad sobre la estructura histológica de las glándulas salivales mayores y para ello, uno de los objetivos particulares más importantes fue establecer un modelo de obesidad en ratas Wistar hembras y machos, inducido por una dieta alta en grasas eficiente, de bajo costo, que permitiera responder a nuestras preguntas de investigación y desarrollar nuevas, y al mismo tiempo, que nos diera la posibilidad comparar los efectos de la obesidad asociados al dimorfismo sexual.

Con base en la experiencia, tanto de nuestro laboratorio como de diferentes reportes de investigación, en primer lugar, establecimos que en las ratas Wistar un aumento de peso corporal superior al 20% con respecto al grupo control, sería considerado como principal indicador de obesidad. De acuerdo con este parámetro, observamos que tanto las hembras como los machos sometidos a la ingesta de la dieta alta en grasas (HFD) que produjimos en el laboratorio, desarrollaron un fenotipo de obesidad al finalizar las 18 semanas del paradigma alimentario. A pesar de no haber encontrado un patrón específico en la conducta alimentaria, sabemos que la dieta suministrada al grupo HFD de hembras y machos contenía un mayor porcentaje de lípidos, que representaron el 60% del aporte calórico, mientras que la dieta del grupo control, aportó apenas un 13% de las calorías consumidas, por lo que el metabolismo de macronutrientes se dio de forma diferencial y se reflejó en la ganancia de peso en los animales HFD de ambos sexos. Esta ganancia de peso corporal en los machos HFD (M) se mostró, como era de esperarse, mayor que en las hembras. Los machos HFD (M) ganaron en promedio 55% de peso sobre su grupo control (m), mientras que las hembras obesas (H) ganaron un 24% de peso con respecto a las ratas control (h). El dimorfismo sexual que registramos en la ganancia de peso, concuerda con lo reportado en trabajos previos donde también se utilizaron ratas Wistar como un modelo de obesidad inducido por dieta alta en grasas. Algunas de estas investigaciones reportaron ganancias de peso en machos que van desde el 19 hasta el 63% por encima del control (Matczuk, 2016; Kolodziej, 2017; Ittichaicharoen, 2017 & Virto et. al., 2017), mientras que los trabajos en los

que se emplearon ratas hembras como modelo biológico, además de ser escasos, reportan una ganancia de peso menor, que fluctúa entre 10 y el 17% por arriba del grupo control (Rodrigues et al., 2015). Asimismo, al analizar los porcentajes de ganancia de peso en un modelo de obesidad, es importante mencionar que, si bien es cierto, que el efecto de la dieta sobre el aumento de la masa corporal está determinado por la composición de la misma, el tiempo de exposición a la dieta también juega un papel muy importante. Ittichaicharoen y colaboradores (2017), aplicaron un paradigma alimentario en ratas Wistar macho durante 16 semanas con una HFD comercial (59.28% lípidos) y obtuvieron una ganancia de peso del 63%. Otro grupo de investigación, como el de Matczuk y colaboradores (2016), generaron un modelo de obesidad también en ratas Wistar macho, pero aplicaron ventanas de tiempo más cortas (6 semanas) y a pesar de utilizar una HFD similar en cuanto a la composición lipídica (60% lípidos) obtuvieron una ganancia de peso menor que correspondió al 19% por encima de su grupo control. Comparado nuestros resultados con los hallazgos de la literatura descritos anteriormente, mostramos que la ventana de tiempo que utilizamos para el paradigma alimentario (18 semanas) y la composición de la HFD no comercial (59.5% lípidos) que estandarizamos en el laboratorio, resultaron ser una combinación muy efectiva para generar un aumento significativo de peso corporal en las ratas macho (M: 55%) y hembra (H: 24%) con respecto a sus controles. Como podemos observar, estos valores entran en el intervalo de ganancia de peso reportado para la mayoría de los modelos de obesidad en roedores. Los resultados anteriores, nos permitieron proponer esta estrategia metodológica como un modelo eficiente y de bajo costo para generar obesidad en ratas Wistar.

Con el fin de caracterizar la obesidad generada en los animales alimentados con la HFD (M y H), al término del paradigma alimenticio evaluamos algunos parámetros somatométricos como la circunferencia abdominal y el índice de masa corporal (IMC). Como se reportó en la sección de resultados de esta tesis, al analizar estos dos parámetros únicamente encontramos diferencias estadísticas en los machos, donde el grupo HFD (M) obtuvo un IMC mayor (0.72) con respecto a su control (0.67). Este resultado correlaciona con el aumento de la adiposidad total, ya que estos machos HFD aumentaron en 3.57% su tejido adiposo con respecto al grupo control (m). Asimismo, observamos que las hembras obesas mostraron un aumento de adiposidad de 2.46% con respecto a las hembras controles, lo que nos permite concluir que, en nuestro modelo, la acumulación de tejido adiposo fue mayor en los machos (M) que en las hembras (H). Este hallazgo es consistente con estudios recientes en roedores, en donde se ha reportado un dimorfismo sexual en el aumento de peso y la acumulación de tejido adiposo. En la literatura se postula que esta diferencia se podría deber a que las hembras tienen una mayor flexibilidad metabólica para adaptarse a los cambios en la dieta, ya que son capaces de regular su gasto energético a través del aumento de la respiración mitocondrial del tejido adiposo blanco y también del incremento en la fuga de protones en las mitocondrias

del tejido adiposo pardo (MacCannell et al., 2021). Por lo anterior, el dimorfismo sexual en el aumento de la adiposidad total que aquí reportamos para nuestro modelo de obesidad, se inscribe una vez más, en lo reportado anteriormente para modelos similares.

Al analizar de forma independiente los porcentajes de peso de los diferentes cojinetes adiposos, observamos que tanto en las hembras HFD (H) como en los machos HFD (M), el mayor aporte de adiposidad total se registró en el tejido adiposo visceral (TAV), que en machos fue 3.5% mayor que el grupo control (m) y en las hembras (H) se incrementó en 2% con respecto a su control (h). Este hallazgo corresponde con lo reportado en dos modelos de obesidad inducida por una HFD (60% lípidos) en ratas Osborne-Mendel y S5B/PI. En ambas cepas, la acumulación de tejido adiposo visceral fue dependiente del sexo, siendo los machos el sexo con mayor diferencia en la acumulación de este tejido (Poret, Gaudet, Douglas, & Primeaux, 2021). Por otra parte, en nuestro modelo registramos que el tejido adiposo subcutáneo (TASC) de los machos HFD (M) se acumuló un 0.3% por encima de los machos control (m) mientras que las hembras HFD (H) aumentaron en un 0.45% más que las hembras control (h). Se sabe que esta acumulación diferencial de tejido graso está determinada por los procesos de remodelación tisular que se llevan a cabo durante el desarrollo de la obesidad. El tejido adiposo puede expandirse por agrandamiento de los adipocitos existentes (hipertrofia) o por aumento del número de adipocitos (hiperplasia) (Mohsen, 2009) y estos procesos son dependientes de la localización del tejido adiposo, el sexo y la edad. En un estudio reciente, la alimentación a largo plazo de ratones con HFD, resultó en un aumento de la adipogénesis (hiperplasia) y de la hipertrofia en el TAV, mientras que el TASC se adaptó eficientemente a la mayor ingesta de energía desarrollando únicamente hipertrofia (Wang, Tao, Gupta, & Scherer, 2013). Estas diferencias impactan de forma importante el estado metabólico de los individuos en condiciones de obesidad. Actualmente se sabe que, en comparación con el TASC, el TAV es un tejido más complejo, más rico en adipocitos y vasos sanguíneos, está más innervado y contiene una mayor cantidad de células inflamatorias e inmunológicas. Debido a estas características, el aumento del TAV genera un impacto negativo más importante en la regulación homeostática del individuo obeso (Vega et al., 2021 & Tatsua, Michael, & Rosario, 2021). En relación con los resultados de este trabajo, la literatura antes mencionada, nos permite afirmar que nuestro modelo de obesidad, aunado a la efectividad que tiene sobre la ganancia de peso, cumple con presentar un efecto importante sobre el aumento de la adiposidad total característica en el desarrollo de la obesidad, misma que se desglosa en un acumulo diferencial del TASC y del TAV, donde el mayor depósito de grasas se registró en el TAV, tal como se mostró en trabajos previos con modelos de obesidad. Asimismo, nuestro modelo presentó un dimorfismo sexual tanto en la ganancia de peso como en la acumulación de tejido adiposo, tal como se ha reportado para otros modelos de obesidad inducidos por dietas altas en grasas.

Por otro lado, una vez que determinamos, en nuestro modelo de obesidad, que el aumento del TAV tuvo un impacto mayor sobre la adiposidad total, nos interrogamos sobre los efectos que esta ganancia tuvo sobre el metabolismo de las ratas, ya que como se mencionó anteriormente, el TAV es un tejido complejo, que en estados de obesidad puede generar alteraciones metabólicas asociadas al desequilibrio funcional de los adipocitos que lo conforman. Con base en lo anterior, para evaluar el metabolismo medimos la glucosa y la insulina en sangre, hicimos pruebas de tolerancia a la glucosa y de resistencia a la insulina y finalmente, evaluamos los niveles plasmáticos de leptina, triacilgliceroles y colesterol total. Los resultados indicaron diferencias significativas en el metabolismo de la glucosa entre los animales HFD y los grupos control. Las hembras HFD (H) presentaron niveles elevados (101.6 mg/dl) de glucemia basal respecto a las hembras control (83.3 mg/dl). De la misma manera, para los machos HFD (M) se registró una glucemia de 107.6 mg/dl un valor por encima del control (87.6 mg/dl). Estos datos indicaron un estado de hiperglucemia en los animales HFD al finalizar el paradigma alimenticio. Está marcada deficiencia en el metabolismo de la glucosa, la confirmamos al realizar una prueba de tolerancia a la glucosa que es comúnmente utilizada para diagnosticar la capacidad que tiene el organismo de metabolizar en el tiempo de 2 horas una dosis determinada de glucosa exógena. Con los valores que se obtienen, se construye una cinética y en ella se evalúan los siguientes aspectos: la concentración inicial de glucosa en sangre a las 12h de ayuno, la concentración después de administrar un estímulo exógeno de glucosa y durante los siguientes 120 min (Muhammad, Tamam, Nibal, & Defronto, 2008), la forma y el comportamiento de la curva de respuesta y el área bajo la curva de la cinética construida.

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta prueba, observamos que la dieta alta en grasas produjo, tanto en hembras HFD (H) como en machos HFD (M), una mayor y prolongada hiperglucemia después de la administración de glucosa exógena generando curvas monofásicas, formas que se comparten con las ratas machos (m) y hembras controles (h), estas curvas se caracterizan por un aumento de la glucosa plasmática hasta alcanzar un pico, seguido de una caída continua (Bervoets, Mewis, & Massa, 2015). Aunque la forma de la curva fue similar entre los grupos HFD (M y H) y los controles NFD (m y h), la cinética de respuesta presentó diferencias. Por su parte, las hembras HFD (H) presentaron porcentajes significativamente mayores de glucosa en los puntos temporales de 15 y 60 min posteriores al estímulo exógeno de glucosa, mientras que los machos HFD (M) presentaron porcentajes de glucosa mayores a partir de los 30 minutos y hasta el final de la prueba a los 120 min, sin regresar a su estado basal. Estos registros son indicadores de un metabolismo alterado de la glucosa (Muhammad, Tamam, Nibal, & Defronto, 2008). Finalmente, mediante el análisis del cálculo del área bajo la curva (AUG), determinamos que el metabolismo de la glucosa fue diferente entre grupos y entre sexos. Los machos HFD (M), parecen presentar un metabolismo de la

glucosa más afectado que las hembras HFD (H), ya que presentaron un AUG 36% mayor que los machos control (m), mientras que las hembras HFD (H) superaron a las hembras control (h) en un 23%. Este resultado se corresponde con lo encontrado por Oliveira y colaboradores (2010), quienes reportaron que, en ratas el consumo de una dieta alta en grasas tiene como consecuencia el desarrollo de una intolerancia a la glucosa (Oliveira et. al., 2010). Asimismo, Mesquita y colaboradores, en 2018, reportaron que en pacientes humanos que cursaban con niveles más elevados de glucosa basal y una mayor área bajo la curva (AUC de glucosa), se correlacionaba con una función disminuida de las células beta pancreáticas y con una mayor prevalencia de síndrome metabólico (Mesquita, Antonioli, Cittolin-Santos, & German, 2018).

Por otro lado, al comparar nuestros resultados de metabolismo de la glucosa con los registrados para la insulina, observamos que no registramos diferencias significativas ni en los niveles de insulina plasmática, ni en la curva de resistencia sensibilidad a la insulina (AUC de insulina) entre los animales HFD (H y M) y los grupos control (h y m). La evidencia antes mencionada, podría indicar que: 1) en nuestro modelo, la desregulación en el metabolismo de la glucosa que observamos probablemente no está determinada exclusivamente por una disfunción pancreática y 2) que la ventana de tiempo en la que las ratas HFD (H y M) fueron sometidas al paradigma alimentario, generó obesidad, pero sin desarrollar síntomas de resistencia a la insulina. Cabe recalcar que estos hallazgos nos permiten hacer uso del modelo que aquí proponemos para poner a prueba diferentes hipótesis en relación a los efectos adversos provocados exclusivamente por la obesidad, sin tener que considerar otras variables asociadas a la resistencia a la insulina.

Una posible explicación para las alteraciones que encontramos en el metabolismo de la glucosa, es que estas modificaciones podrían estar relacionadas con los altos niveles de leptina detectados en los animales HFD (Ahima & Lazar, 2008). Nuestros resultados indicaron que las ratas macho y hembra (M y H) presentaron estados de hiperleptinemia con niveles de leptina plasmática significativamente mayores a los grupos control (m y h). Las hembras HFD (H) presentaron un valor promedio de 6.7 ng/ml de leptina, mientras que las hembras control (h) mostraron 1.6 ng/ml de esta adipocina, lo que se traduce en una concentración de leptina 4 veces mayor en las hembras HFD (H). Por su parte, los machos también reflejaron este fenómeno, ya que los HFD (M) superaron en 2.8 veces la concentración de leptina en comparación con los machos control (m), presentando una concentración de 2.94 ng/ml de leptina lo que contrasta significativamente con el promedio de 1.03 ng/ml encontrado en los machos control (m). En 2013, Fujikawa y colaboradores realizaron un estudio en roedores, donde demostraron que la leptina beneficia la detección de la glucosa a nivel hipotalámico, ayudando así a regular la homeostasis de la glucosa plasmática. En condiciones fisiológicamente sanas el trabajo de Rosa Li (2020) describe, mediante diversos mecanismos moleculares, que la leptina promueve en las

neuronas POMC (pro-opiomelanocortina) un aumento en el flujo de la glucosa a nivel hipotalámico. Este aumento de leptina reduce la producción de la glucosa producida por el hígado y por lo tanto, también disminuye sus niveles plasmáticos de forma independiente al mecanismo mediado por la insulina. (Lam, Gutierrez-Juarez, Pocai, & Rossetti, 2005; Fujikawa et al., 2013; Li, Zhang, & Lam, 2020). Asimismo, un estudio en ratas alimentadas con dieta alta en grasas, reportó que este mecanismo de regulación homeostática de la glucosa plasmática por medio de la leptina se encontraba alterado ya que bajo condiciones de alimentación HFD no se logró reducir la producción de glucosa hepática, debido posiblemente a un estado de resistencia a la leptina a nivel hipotalámico (Abraham, Rasti, Bauer, & Lam, 2018). De acuerdo con las investigaciones antes mencionadas podemos decir que el paradigma alimentario que utilizamos para generar nuestro modelo de obesidad, presenta alteraciones metabólicas de la glucosa, que se traducen en una intolerancia a la glucosa, misma que podría no ser totalmente dependiente al metabolismo de insulina, ya que no encontramos alteraciones en la sensibilidad o en los niveles plasmáticos de esta hormona. Sin embargo, sí encontramos un estado de hiperleptinemia en las ratas HFD (M y H), que en consistencia con lo descrito en la introducción y en la sección de resultados, se debe a un aumento en la acumulación de tejido adiposo, y muy probablemente sea este parámetro el que este causando los estados de intolerancia a la glucosa en nuestro modelo.

De la misma forma el aumento en el tejido adiposo, característico en el desarrollo de la obesidad, promueve alteraciones en el metabolismo de lípidos (Vega & Rico, 2019). Dentro de los parámetros que utilizamos para caracterizar nuestro modelo de obesidad, medimos las concentraciones plasmáticas de triacilgliceroles y colesterol total. Tal como se describió en la sección de resultados, no encontramos diferencias en las concentraciones ni de triacilgliceroles ni de colesterol total entre las hembras HFD (H) y las hembras control (h). Sin embargo, los machos HFD (M), a pesar de no mostrar diferencias en la concentración de triacilgliceroles con respecto a los machos control (m), sí mostraron niveles estadísticamente mayores de colesterol total, ya que obtuvieron una concentración promedio de 1.7 mMol/L, mientras que los machos control (m) presentaron una concentración de 1.33 mMol/L, es decir, los machos HFD (M) presentan concentraciones 30% mayores con respecto a los controles para este parámetro. Sabemos que en los mamíferos, el almacenamiento de energía a largo plazo se logra mediante la captación y producción de triacilgliceroles, así como de colesterol que se almacenan en los adipocitos, promoviendo una expansión del tejido adiposo en respuesta al exceso calórico, como se mencionó anteriormente, esta expansión (hipertrofia e hiperplasia) es una adaptación fisiológica que se desarrolla en condiciones de obesidad (Wang, Tao, Gupta, & Scherer, 2013; Poret, Gaudet, Douglas, & Primeaux, 2021). Un factor muy importante que interviene en este proceso es la insulina, ya que esta hormona estimula la captación de triacilgliceroles en los adipocitos, contribuyendo a la adipogénesis e inhibiendo la lipólisis, evitando así el

aumento de los triacilgliceroles plasmáticos (González et al., 2018). Tal como observamos en los resultados de nuestro modelo, ni la concentración plasmática y ni el metabolismo de la insulina se vieron afectados, por lo que haciendo una correlación con lo encontrado en la literatura podríamos inferir que las concentraciones de triacilgliceroles de los grupos HFD (H y M) se mantuvieron estadísticamente similares a los grupos control (h y m), gracias al efecto de la insulina. Por otro lado, en diferentes estudios se ha reportado que las dietas altas en grasas que contienen un mayor aporte de ácidos grasos insaturados tienden a disminuir las concentraciones de colesterol total, mientras que las dietas altas en grasas con mayor aporte de ácidos grasos saturados, aumentan los niveles de colesterol total en plasma (Ittichaicharo et al., 2016; Koichiro et al., 2017), tal como se reporta en un estudio hecho en roedores por Del Pozo y colaboradores en 2017, quienes demostraron que la proporción de ácidos grasos de la dieta se encontraba asociada al perfil lipídico de los animales expuestos a ella. (Del Pozo et al., 2017). De acuerdo con la composición de nuestra dieta, la proporción de ácidos grasos saturados e insaturados fue de 1:1 y aunque no encontramos diferencias en la concentración plasmática de colesterol total en las hembras, sí encontramos un aumento significativamente mayor en la concentración de colesterol total para los machos HFD (M), a pesar de que la HFD estandarizada para este trabajo no tenía una mayor proporción de grasas saturadas, este hallazgo podría estar relacionado en primer lugar, con el tiempo de exposición a la dieta, ya que en los trabajos antes mencionados el tiempo máximo de exposición al paradigma alimentario fue de 16 semanas, mientras que nuestro modelo de obesidad mantuvo la alimentación con HFD durante 18 semanas y en segundo lugar a un posible dimorfismo sexual en el metabolismo del colesterol.

El conjunto de todos los resultados obtenidos al final del paradigma alimentario, nos permitieron clasificar a las ratas hembra (H) y macho (M) HFD, como individuos obesos. Para los fines de este trabajo definimos una condición de obesidad cuando los valores en los siguientes criterios fueron significativamente mayores a los grupos control (m y h): ganancia de peso corporal (M:633±15%, m:578±16.5%; H:250±5.3%, h:226±5.6%), porcentaje de adiposidad total (M:6.87±0.29%, m:3.31±0.19%; H:4.87±0.59%, h:2.4±0.32%), glucosa basal (M:107.6±1.9mg/dl, m:87.6±2.5mg/dl; H:101.6±1.8mg/dl, h:83.3±1.4mg/dl) intolerancia a la glucosa (M:33.6±1.6x10³, m:27.7±3.1x10³; H:28.5±1.4x10³, h:23.2±0.6x10³) y leptina plasmática(M:2.94±1.3ng/ml, m:1.03±0.25ng/ml; H:6.7±1.5ng/ml, h:1.6±1.2ng/ml). Una vez que determinamos los parámetros de nuestro modelo de obesidad en ratas Wistar machos y hembras, el segundo objetivo particular de este trabajo fue determinar el efecto de esta patología sobre la histología de las glándulas salivales mayores (parótida, submandibular y sublingual). Para cumplir con ello, analizamos los porcentajes de peso de estos órganos secretores y posteriormente realizamos

una cuantificación de los diferentes acinos que los componen, mediante un protocolo de cuantificación que fue estandarizado en el laboratorio para estos fines.

Como mencionamos en la introducción, la función principal de las glándulas salivales mayores es la producción de la saliva, un líquido acuoso que contiene enzimas, electrolitos y moco, que a su vez mantiene la homeostasis e inicia el proceso de digestión en la cavidad oral (Amano, Mizobe, Bando & Sakiyama, 2012). Sin embargo, se ha reportado en estudios previos que la fisiología e histología de estos órganos se ven afectadas durante el desarrollo de la obesidad. Para este trabajo, el análisis del porcentaje de peso para las glándulas salivales parótidas, no mostró diferencias significativas entre los machos HFD(M) y los controles (m). Sin embargo, las hembras HFD (H) presentaron un porcentaje de peso con respecto al peso corporal promedio de 0.24% que en comparación con el 0.32% de las hembras control (h), representó una atrofia del 25% de las glándulas parótidas de las hembras HFD. Sorpresivamente, al realizar la cuantificación de acinos serosos que componen a la glándula parótida (GSP), observamos que no se registraron diferencias en el número de acinos entre las hembras HFD (H) y las control (h), mientras que los machos HFD (M), a pesar de no mostrar diferencias en el porcentaje de peso de la GP, presentaron en promedio 378.1 acinos serosos por campo, un número que superó en 1.3 veces la cantidad de acinos serosos presentes en las glándulas parótidas de los machos control (m), quienes obtuvieron 280.6 acinos serosos por campo. En un estudio donde se evaluó el efecto de la dieta alta en grasas sobre el funcionamiento de las glándulas salivales de ratas hembra, se describe que aunado al aumento en los niveles plasmáticos de diversos marcadores metabólicos como la leptina, se observa un decremento en el tamaño de las glándulas salivales (Rodrigues, et al., 2015). Por otro lado, también se ha reportado en modelos murinos que en condiciones de hiperleptinemia se observa un decremento en el tamaño de las glándulas salivales como resultado de un aumento y desregulación de las funciones normales del tejido adiposo (Higa et al., 2002 & Schapher et al., 2009). Estos hallazgos concuerdan con nuestros resultados de porcentaje de peso de la glándula parótida, donde las hembras HFD (H), presentaron una disminución del 25% al mismo tiempo que cursaban con hiperleptinemia. Asimismo, en 2018, Lamy y colaboradores, demostraron que en un modelo de hiperleptinemia inducida en ratas, se produjo una disminución en el tamaño y número de acinos serosos de las glándulas parótidas (Lamy et al., 2018). Sin embargo, contrario a lo reportado por Lamy, nuestros resultados no muestran una disminución en el número de acinos serosos para las glándulas parótidas de estas hembras HFD(H). Hipotetizamos que, muy probablemente esta atrofia en el porcentaje de peso de las glándulas parótidas pueda estar determinado por una reducción en el tamaño de los acinos y no se encuentre directamente relacionada al número de estos, aunque es necesario realizar posteriormente una evaluación del tamaño acinar para poner a prueba esta hipótesis. Por otro lado, una investigación reciente de Kolodziej y colaboradores (2017), mostró que la

exposición prolongada a una dieta alta en grasas provoca un aumento en el tamaño de las glándulas parótida y submandibular de ratas macho, debido a la infiltración de adipocitos en estos órganos, que a su vez alteran su funcionamiento y disminuyen la tasa de flujo salival en estos animales (Kolodziej et al., 2017). Estas investigaciones nos permiten plantear que si bien es cierto que contrario a lo reportado, en nuestros resultados los machos HFD (M), presentaron un aumento del 30% en el número de acinos serosos de la glándula parótida con respecto al control (m), estas diferencias no reflejaron cambios en el porcentaje de peso de las glándulas parótidas, posiblemente es necesario, al igual que en las hembras, realizar un estudio a futuro sobre el tamaño de los acinos para poder determinar si posiblemente este sea un factor determinante. Asimismo, tal como se menciona en la literatura el aumento de la glándula parótida puede estar determinado por la infiltración adiposa. Sin embargo, el análisis histológico tampoco muestra una infiltración relevante de adipocitos en esta glándula. Estos resultados, nos permiten inferir que el efecto de la obesidad inducida por una exposición prolongada a una dieta alta en grasas (HFD 59.5% lípidos), afectó el tamaño y la composición histológica de las glándulas parótidas, de manera dependiente del sexo. Siendo las hembras, las más afectadas, ya que se generó una atrofia de la GSP.

En cuanto al análisis de porcentaje de peso para el paquete glandular submandibular-sublingual, no registramos diferencias entre los grupos HFD (M y H) con respecto a sus homólogos NFD (m y h). Este resultado es consistente con la cuantificación de acinos mucosos de la glándula sublingual (GSL), en la que tampoco hubo diferencias entre los grupos HFD (M y H) con respecto al número de acinos mucosos de las GSL en las ratas control (m y h). Sin embargo, la evaluación del número de acinos en la glándula submandibular (GSM), presentó diferencias significativas únicamente en el número de acinos mucosos y solamente en las hembras, donde las HFD (H) presentaron 37.5 acinos mucosos por campo, una cantidad que representó un 23.7% por debajo del número de acinos mucosos en las hembras control (h), quienes presentaron 49.2 acinos por campo. Nuestros resultados se corresponden con el trabajo de Hamed y colaboradores en 2021, quienes realizaron un análisis sobre los cambios histológicos de las glándulas sublinguales y submandibulares de ratas Sprague-Dawley alimentadas con una dieta alta en grasas. En este estudio reportaron que la glándula submandibular presentó una disminución en el número de acinos (entre serosos y mucosos), mientras que las glándulas sublinguales no presentaron cambios en el número de acinos. Este mismo efecto lo encontramos en este trabajo en las glándulas submandibulares y sublinguales de las ratas Wistar HFD (M y H), donde la obesidad no mostró una alteración en el porcentaje de peso del paquete conformado por ambas glándulas (GSL y GSM). Asimismo, el número de acinos mucosos de las glándulas sublinguales no fue diferente entre los animales HFD (M y H) y los controles (m y h). Nuestros resultados indican que la obesidad tiene un efecto diferencial en el número de acinos serosos y mucosos de la glándula

submandibular, promoviendo así una disminución del tipo mucoso de manera dependiente del sexo, ya que sólo se encontró este efecto en hembras.

Del diseño y desarrollo, así como de los resultados en nuestro modelo de obesidad de ratas Wistar hembra y macho, podemos destacar principalmente dos aspectos: 1) con base en la revisión bibliográfica que hicimos, es la primera vez que se realiza un análisis comparado de la histología de las tres glándulas salivales mayores (GP, GSM y GSL) en un mismo modelo de obesidad en ratas Wistar y 2) pudimos describir las alteraciones de cada glándula para ambos sexos, bajo las mismas condiciones experimentales en cuanto a la composición de la dieta alta en grasas, así como el tiempo de exposición a la misma. Estos dos aspectos nos permiten proponer que, de manera global, muy probablemente existe un dimorfismo sexual en los efectos de la obesidad sobre la histología de las glándulas salivales mayores.

La evidencia expuesta anteriormente, nos llevó a preguntarnos sobre la posibilidad de que los efectos de la obesidad en las ratas Wistar HFD hembra y macho (F0), podrían reflejarse también en sus crías (F1), mediante un efecto intergeneracional promovido por la exposición a un ambiente obesogénico parental. Esta interrogativa surgió de la ya documentada plasticidad del desarrollo y la hipótesis de los orígenes tempranos de la salud y la enfermedad (DOHaD) propuesta por Baker en 2007, donde se sugiere que las exposiciones ambientales transitorias experimentadas en la vida temprana pueden tener efectos a corto y largo plazo. Por lo tanto, podría existir el riesgo de desarrollar o de ser propenso a la obesidad, debido a un metabolismo programado por el ambiente prenatal en el que se desarrolla un individuo (Baker, 2007 & Strakovsky et al., 2015).

De acuerdo con nuestros resultados y con base en los parámetros de obesidad establecidos para la generación F0, pudimos determinar que la generación F1 de crías, tanto de madres obesas (H) como de padres obesos (M), no desarrollaron esta patología. Sin embargo, detectamos que la generación de ratas F1, presentó parámetros somatométricos y metabólicos alterados, así como anomalías histológicas en las glándulas salivales parótidas, aun cuando durante toda su vida estos animales fueron alimentados con una dieta estándar (NFD).

Al analizar la ganancia de peso de la generación F1, observamos que la obesidad materna no generó cambios significativos en las crías hembra (Hm) ni macho (Hm). Contrario a esta observación, el efecto de la obesidad paterna sí generó una pérdida significativa de peso tanto en las crías hembra (Mh) como en las ratas macho (Mm) con respecto a sus grupos control (mh y mm) al final de la ventana de seguimiento (18 SPN). En las SPN 11, 14, 16, 17 y 18 de la cinética de peso detectamos porcentajes significativamente menores en las hijas de padres obesos (Mh) respecto a las hijas de padres en normopeso (mh), acumulando así una pérdida del 12.3% de peso en comparación con las hembras de padres normopeso. Por su parte, los

hijos de padres obesos (Mm), presentaron una cinética similar a la de hembras (Mh), donde, desde la SPN 11 mostraron porcentajes de peso menores a los hijos de padres normopeso (mm), esta diferencia persistió en las SPN 14, 15, 17 y 18, lo que se resume en una pérdida total del 14% de peso comparado con el porcentaje en los hijos de padres normopeso (mm).

Asimismo, al igual que en la generación F0, nos interesó evaluar la composición corporal de la generación F1 en términos de la adiposidad total, analizando el porcentaje de TAV y TASC. Los resultados mostraron que ni la obesidad materna, ni la paterna mostraron efectos significativos sobre la cantidad de tejido adiposo.

Interesantemente, la obesidad paterna tampoco tuvo efectos sobre el IMC o la circunferencia abdominal de las crías F1. Estos resultados se corresponden con los encontrados en un estudio previo donde se analizó a la progenie femenina de ratas macho obesos y no se reportaron diferencias significativas en los parámetros somatométricos (Sheau-Fang, et al., 2010). Estos hallazgos nos permiten sugerir que si bien la obesidad paterna presentó una pérdida de peso en la progenie masculina y femenina, no hubo diferencias en los demás parámetros y haciendo énfasis en la adiposidad, es relevante destacar, que si bien no hay diferencias estadísticas si hay una tendencia tanto en las crías hembra como en machos a presentar porcentajes mayores de TAV y adiposidad total, un fenómeno que fue marcado y significativo en los machos HFD (M) F0, por lo que esta disminución de peso, podría estar asociada a otro tipo de tejido o posiblemente la ventana de tiempo que determinamos para el análisis de la generación F1, no nos permite visualizar la posibilidad de que más tarde en el desarrollo se pudiera generar un aumento en la ganancia de peso.

En cambio la obesidad materna a pesar de no presentar diferencias significativas en la ganancia de peso, sí tuvo efecto sobre el IMC de su progenie masculina (Hm), ya que estos machos presentaron un índice de $0.78g/cm^2$, que fue 7% mayor que en las crías machos (hm) de madres normopeso, quienes obtuvieron un índice de $0.71g/cm^2$. Este resultado se relaciona con lo encontrado en estudios anteriores en roedores, en donde se observó que las madres con obesidad inducida por dietas altas en grasas, gestan crías que además de presentar alteraciones metabólicas, muestran un aumento significativo en el IMC después del destete (Samuelsson et al., 2008 & Chen, Simar, Lambert, Mercier, & Morris, 2008). Además, en relación a nuestros resultados de ganancia de peso, en el trabajo de Parlee y colaboradores (2014), se concluyó que, si bien la obesidad materna se ha relacionado positivamente con un aumento en el peso de las crías, parámetro predictor de diferentes trastornos metabólicos, no es una condición necesaria para que se desarrollen alteraciones como la hiperglucemia e hiperinsulinemia ya que estos trastornos metabólicos se pueden desarrollar sin que se registren cambios de peso corporal en la progenie (Parlee, Ormond, & MacDougald, 2014).

En este trabajo mostramos que la obesidad parental tuvo efectos adversos sobre el metabolismo de la glucosa en la progenie masculina (Hm y Mm) pero no en la femenina (Hh y Mh). Tanto los machos hijos de madres obesas (Hm) como los machos hijos de padres obesos (Mm), presentaron estados de intolerancia a la glucosa, aunque únicamente la obesidad materna mostró diferencias significativas en la glucemia basal de su progenie. Las crías machos de madres obesas (Hm) presentaron niveles elevados de glucemia basal (88 mg/dL) respecto a los machos hijos de madres con normopeso (83.1mg/dL), estos datos indicaron un estado de hiperglucemia producto de la obesidad materna. Sin embargo, los resultados observados en la prueba de tolerancia a la glucosa para crías macho de madres o padres obesos (Hm y Mm), indicaron alteraciones en el metabolismo de este carbohidrato. En cuanto a los machos hijos de madres obesas (Hm), en la cinética de respuesta al estímulo de glucosa exógena encontramos porcentajes de glucosa significativamente mayores en los tiempos 15, 90 y 120 min, mientras que los machos hijos de padres obesos (Mm) presentaron porcentajes de glucosa significativamente mayores en los tiempos 15, 30 y 120 min, con respecto a los porcentajes de glucosa de sus respectivos controles (hm y mm). De la misma forma que en las ratas obesas de la generación F0 (H y M), los datos registrados para la generación F1 indicaron un metabolismo de la glucosa alterado (Muhammad, Tamam, Nibal, & Defronto, 2008). Mediante el análisis del área bajo la curva (AUG) observamos que el metabolismo de la glucosa pareciera estar alterado en mayor medida por un efecto de la obesidad materna que por el de la obesidad paterna. Esta observación se apoya en los datos que muestran que los machos hijos de madres obesas (Hm) presentaron un AUG 23.4% mayor que sus controles (hm), mientras que los machos hijos de padres obesos (Mm), superaron a las crías control (mm) solo en un 20%.

Siguiendo la hipótesis de los orígenes tempranos de la salud y la enfermedad (DOHaD), nuestros resultados sobre el metabolismo de la glucosa se podrían explicar gracias a los hallazgos del trabajo de Hai-Yan y colaboradores, en el cual determinaron que las crías de padres obesos alimentados con una dieta alta en grasas (HFD 60% lípidos) mostraron estados de hiperglucemia, tal como nuestros resultados para (Mm), debido a que las células germinales de los padres obesos presentaban una metilación en los genes *Igf2/H19*, la cual contribuyó a una expresión elevada de la enzima fosfoenol-piruvato-carboxicinas (PEPCK), clave en la gluconeogénesis. Ellos demostraron que esta alteración fue improntada en la descendencia y por lo tanto se observan niveles alterados de la glucosa plasmática (Hai-Yan et al., 2021). Actualmente se sabe que los espermatozoides transportan moléculas de ARN no codificantes que tienen la capacidad de modular la metilación del ADN, por lo tanto, al momento de la fusión del núcleo celular espermático con el del ovocito, estos ARN podrían estar improntando diversas condiciones en su descendencia (Fullston, et al., 2013 & Zhang, Shi, Rassoulzadegan, Tuorto, & Chen, 2019).

En cuanto a los efectos de la obesidad materna con respecto a los niveles de hiperglucemia que detectamos en las crías macho de madres obesas (Hm), se podrían explicar gracias a la información reportada en el trabajo de Cerf y colaboradores (2007) en el que se muestra que, la obesidad materna de ratas Wistar inducida por ingesta de una dieta alta en grasas durante la gestación, tiene un efecto sobre la población de las células beta pancreáticas de las crías hembra y macho. Se describe, que durante las primeras tres semanas de vida de las crías se reduce significativamente el número de células beta, lo que conlleva a una secreción deficiente de insulina y por lo tanto a estados alterados en la glucemia basal y en el metabolismo de la glucosa. Esta disminución de células beta pancreáticas aumenta semanas después del destete hasta alcanzar cifras similares al control, interesantemente, se reporta que a pesar de ello los estados de intolerancia a la glucosa prevalecen en estas crías (Cerf, Williams, Chapman, & Louw, 2007). Finalmente, postulan que esto se pudiera explicar debido a una disfunción de las células beta en la producción de insulina. Asimismo, un estudio posterior del equipo de Cerf, mostró que la misma alimentación con la dieta alta en grasas en ratas Wistar hembra durante la gestación o la lactancia también generó estados de intolerancia a la glucosa en la descendencia desde el destete (Cerf & Louw, 2010). De acuerdo con nuestros resultados y la literatura antes citada, podemos mencionar que nuestro modelo de obesidad parental, mostró un efecto diferencial dependiendo del sexo de las crías, es decir, sin importar si la obesidad estaba presente en la madre (H) o en el padre (M), las crías afectadas metabólicamente siempre fueron los machos de la generación F1.

En resumen, el modelo de obesidad intergeneracional que aquí presentamos, se caracteriza por tener efectos distintos debido a si el padre o la madre era portador de la obesidad. Por un lado, los efectos de la obesidad materna únicamente se vieron reflejados en la progenie masculina (Hm), estos machos comparados con los machos descendientes de madres con normopeso (hm), presentaron un aumento del 7% en el IMC, un aumento del 6% en los niveles de glucosa basal e intolerancia a la glucosa determinada por un aumento del 23.4% en la cuantificación del área bajo la curva de respuesta. Y, por otro lado, la obesidad paterna se caracterizó por una disminución del 12% de peso en las hembras (Mh) y del 14% de peso en los machos (Mm) comparados con las crías (mh y mm) de padres con normopeso, reflejo intolerancia a la glucosa, únicamente de su progenie masculina (Mm), determinada por un aumento del 20% en la cuantificación del área bajo la curva de respuesta con respecto a los machos descendientes de padres con normopeso (mm).

Al mismo tiempo, estos datos nos hablan de un dimorfismo sexual en la adaptación de la progenie al estrés de un ambiente obeso, ya que los machos se vieron más

afectados independientemente de si la obesidad estaba presente en la madre o en el padre.

Una vez que determinamos las alteraciones somatométricas y metabólicas en la generación F1, producto de la obesidad parental, nos dimos a la tarea de averiguar si las alteraciones en las glándulas salivales mayores que encontramos en la generación F0 de ratas obesas (M y H) podrían haber sido improntadas en la generación F1. Nuestros resultados muestran un efecto diferencial entre la obesidad paterna y materna sobre las glándulas salivales mayores, ya que, mientras la obesidad materna no tuvo efectos sobre el porcentaje de peso de ninguna de las tres glándulas salivales (parótida y el paquete submandibular-sublingual), ni en el número de acinos, ni en la estructura histológica; la obesidad paterna sí mostró un efecto sobre la glándula parótida, tanto de su progenie femenina (Mh) como masculina (Mm). Al analizar estos resultados descubrimos que las crías de padres obesos (Mh y Mm) presentaron glándulas parótidas de mayor tamaño con respecto a la descendencia de hembras o machos de padres normopeso (mh y mm). Específicamente, las hijas de padres obesos (Mh) mostraron un porcentaje de peso de las glándulas parótidas 37.9% más que el porcentaje que obtuvieron las hijas de padres con normopeso (mh). Este mismo efecto se observó en los machos, aunque para este sexo la diferencia fue mayor, ya que las crías machos (Mm) superaron el porcentaje de peso de las glándulas parótidas de los hijos de padres con normopeso (mm) en un 50%. En concordancia con estos resultados, al analizar el número de acinos serosos presentes en las glándulas parótidas de las crías macho (Mm), observamos un aumento del 23.8% de acinos serosos por campo con respecto a los machos hijos de padres normopeso (mm). De la misma manera, las hembras hijas de padres obesos (Mh) presentaron un 15.6% más de acinos serosos por campo que el porcentaje encontrado en las hembras hijas de padres normopeso (mh). Sin embargo, este último resultado no alcanzó una significancia estadística. Finalmente, la obesidad paterna no registró ningún efecto sobre el porcentaje de peso, el número de acinos serosos, ni la estructura histológica del paquete submandibular-sublingual. En estudios clínicos de humanos, se ha demostrado que la obesidad en niños y jóvenes se correlaciona positivamente con una alta incidencia de patologías bucales tales como la caries, la enfermedad periodontal y la xerostomía (Touger & Mobley, 2003; Kelishadi et al., 2010). Asimismo, el desarrollo de estas patologías podría estar relacionado con alteraciones en la estructura y función de las glándulas salivales, ya que son órganos que se ven afectados durante la obesidad (Higa et al., 2002; Schapher et al., 2009; [Rodrigues, et al., 2015](#); Kolodziej et al., 2017 & Lamy et al., 2018).

Los resultados que obtuvimos en la generación F1, nos indicaron que estas ratas no cursaban con obesidad. Sin embargo, la obesidad paterna tuvo efectos sobre las glándulas salivales mayores, específicamente en la glándula parótida, donde observamos un aumento de tamaño de este órgano tanto en hembras (Mh) como

en machos (Mm). Es importante destacar que Kolodziej y colaboradores (2017), mostraron que el tamaño de las glándulas parótida y submandibular de ratas podría estar aumentado debido a la infiltración de adipocitos en estos órganos, aunque de acuerdo con los análisis histológicos, no encontramos infiltración de adipocitos en las glándulas parótidas de los machos (Mm) o hembras (Mh) afectados. Por otro lado, encontramos que al menos en machos (Mm), el número de acinos serosos por campo de las glándulas parótidas fue significativamente mayor (23.8%) con respecto a su grupo control (mm), de igual manera las hembras (Mh) presentaron un porcentaje mayor (15.6%) de estos acinos con respecto a su grupo control (mh) aunque este último resultado no alcanzo diferencia estadística, proponemos que el aumento en el porcentaje de peso de las glándulas parótidas puede estar positivamente asociado al aumento en el número de acinos. Tal como se mencionó anteriormente existen mecanismos de impronta genética que modulan el comportamiento fisiológico en los individuos expuestos a ambientes adversos como es la obesidad paterna (Fullston, et al., 2013 & Zhang, Shi, Rassoulzadegan, Tuorto, & Chen, 2019). De acuerdo con los resultados aquí mostrados, estos mecanismos de impronta genética podrían estar afectando posiblemente el ciclo celular de los acinos serosos. Sin embargo, para poder probar esta hipótesis sería necesario indagar sobre las marcas epigenéticas reportadas que afectan el ciclo celular y comprobar si estas se encuentran en nuestro modelo. Por otro lado, sería deseable realizar un modelo, donde la generación F1 continuará con una alimentación HFD para mimetizar las conductas humanas y potenciar los efectos de la alimentación.

La importancia de desarrollar este tipo de modelos es sumamente relevante en la identificación de los factores que intervienen en las alteraciones tanto del desarrollo de la obesidad, como de las patologías asociadas a esta condición. Asimismo, los resultados generados en este trabajo sirven de antecedente para la acumulación de evidencias en ciencia básica que puedan en un futuro aportar a entender los procesos patológicos asociados a la obesidad en los problemas clínicos de la salud oral, y por lo tanto llevar al desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas al restablecimiento del funcionamiento óptimo de las glándulas salivales en individuos con sobrepeso y/u obesidad.

XI CONCLUSIONES

1. Se estableció un modelo de obesidad en ratas Wistar hembra y macho mediante la aplicación de un paradigma alimentario de 18 semanas, utilizando una dieta alta en grasas con un 59.5% de aporte calórico proveniente de lípidos, en una proporción 1:1 de ácidos grasos saturados y monoinsaturados.
2. La obesidad en las hembras (H) se caracterizó mediante una ganancia en el peso corporal del 24%, un aumento del tejido adiposo total del 2.5%, un incremento de la glucemia basal del 22%, así como por presentar intolerancia a la glucosa (23% AUC) y cursar con hiperleptinemia.
3. La obesidad en los machos (M) se caracterizó mediante una ganancia en el peso corporal del 55%, un aumento del tejido adiposo total del 3.6%, un incremento de la glucemia basal del 23%, así como por presentar intolerancia a la glucosa (36% AUC) y cursar con hiperleptinemia e hipercolesterolemia (30%).
4. La obesidad en las hembras (H) promovió una atrofia del 25% en el peso de las glándulas salivales parótidas y al mismo tiempo una disminución del 23.7% en los acinos mucosos presentes en las glándulas salivales submandibulares.
5. La obesidad en los machos (M) generó un aumento del 30% en el número de acinos serosos de las glándulas salivales parótidas.
6. El efecto de la obesidad materna (H) sobre su descendencia (F1), únicamente se manifestó en las crías macho (Hm) mediante un aumento del 9% en el IMC, un incremento del 6% en la glucemia basal y una intolerancia a la glucosa (23% AUC).
7. El efecto de la obesidad paterna (M) sobre su descendencia (F1) se manifestó en las crías hembra (Mh) únicamente con una pérdida de peso corporal del 12%; mientras que en las crías macho (Mm) se manifestó con una pérdida en el peso corporal del 14% y una intolerancia a la glucosa (20% AUC).

8. La obesidad materna no generó ningún cambio en las glándulas salivales mayores su progenie (Hh y Hm).

9. En contraste, la obesidad paterna produjo un aumento en el peso de las glándulas parótidas de las crías hembra (Mh) y macho (Mm) del 37,9 y 50% respectivamente. Así como un aumento del 23.8% en el número de acinos serosos presentes en las glándulas parótidas de la progenie masculina (Mm).

XII PERSPECTIVAS

1. Determinar en ratas Wistar hembra y macho de la generación F0 si existe una diferencia en la tasa de flujo salival (ml/min) anterior (3 SPN) y posterior (22 SPN) a la aplicación del paradigma alimenticio entre las ratas HFD y su grupo control (NFD)
2. Analizar la composición de la saliva anterior (3 SPN) y posterior (22 SPN) a la exposición de la dieta alta en grasas en ratas Wistar hembra y macho de la generación F0.
3. Determinar si existen cambios en el perfil hormonal de las ratas Wistar hembra y macho de las generaciones F0 y F1.
4. Cuantificar los receptores de leptina (Ob-Rb) en las glándulas salivales mayores de las generaciones F0 y F1.
5. Evaluar los posibles cambios en la ultraestructura (vacuolas y mitocondrias) de los acinos de las glándulas salivales mayores de las generaciones F0 y F1.

XII REFERENCIAS

- Abraham, M., Rasti, M., Bauer, P., & Lam, T. (2018). Leptin enhances hypothalamic lactate dehydrogenase A (LDHA)-dependent glucose sensing to lower glucose production in high-fat-fed rats. *Journal of Biological Chemistry.*, 4159-4166.
- Ahima, R., & Lazar, M. (2008). Adipokines and the peripheral and neural control of energy balance. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 22(5), 1023–1031.
- Ajani, U. A., Lotufo, P. A., Gaziano, J., Lee, I.-M., Spelsberg, A., Buring, J. E., Manson, J. E. (2004). Body mass index and mortality among US male physicians. *Annals of Epidemiology, Volume 14, Issue 10*, 731-739.
- Amano, O., Mizobe, K., Bando, Y., & Sakiyama, K. (2012). Anatomía e histología de las principales glándulas salivales humanas y de roedores. *Resumen del taller patrocinado por la sociedad japonesa de glándulas salivales. Acta histochemica et cytochemica*, 241-250.
- Baker, D. (2007). The origins of the developmental origins theory. *Journal of Internal Medicine, Vol. 261, Issue 5*, 412-417.
- Bellentani, S. et al. (2000). Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in northern Italy. *Ann Intern Med*, 132, 112-117.
- Barrès, R., & Zierath, J. (2016). The role of diet and exercise in the transgenerational epigenetic landscape of T2DM. *Nature reviews. Endocrinology*, 441-451.
- Bays, H. e. (2020). Obesity Algorithm. Centennial. CO: *Obesity medicine Association*.
- Beregova, T., Falayeyeva, T., Neporada, K., & Gordienko, L. (2014). Metabolic Changes in Salivary Glands of Rats under Glutamate-Induced Obesity. *Journal of Dentistry, Oral Disorders & Therapy*, 2-4.
- Bervoets, L., Mewis, U., & Massa, G. (2015). The shape of the plasma glucose curve during an oral glucose tolerance test as an indicator of Beta cell function and insulin sensitivity in end-pubertal obese girls. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*, 47(6), , 445-451.
- Botts, S., & Leininger, J. (2018). Salivary Glands. En Boorman, *Pathology of the Rat* (págs. 23-34). NC, Estados Unidos: Elsevier Inc.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of micro-gram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem*, 72:248-254.

- Buduneli, N., Biyikoglu, B., Ilgenli, T., Buduneli, E., Nalbantsoy, A., & Sarac, F. (2014). Is obesity a possible modifier of periodontal disease as a chronic inflammatory process? A case-control study. *Journal of Periodont Res.*, 465-471.
- Casanello, P., Krause, B., Castro, J., & Uauy, R. (2016). Epigenética y obesidad. *Revista Chilena de Pediatría*, 335-342.
- Cerf, M. E., Williams, K., Chapman, C. S., & Louw, J. (2007). Compromised β -Cell Development and β -Cell Dysfunction in Weanling Offspring From Dams Maintained on a High-Fat Diet During Gestation. *Pancreas*, 347-353.
- Cerf, M., & Louw, J. (2010). High Fat Programming Induces Glucose Intolerance in Weanling Wistar Rats. *Horm Metab Res*, 307-310.
- Chavarro J. et al. (2012). Body mass index and short-term weight change in relation to treatment outcomes in women undergoing assisted reproduction. *Fertil Steril*; 98 (1), 109-116.
- Chen, H., Simar, D., Lambert, K., Mercier, J., & Morris, J. (2008). Maternal and postnatal overnutrition differentially impact appetite regulators and fuel metabolism. *Endocrinology*, 149, 5348-5356.
- Cypess, A. (2022). Reassessing Human Adipose Tissue. *N Engl J Med*, 768-779.
- Del Pozo, R., Mardones, L., Villagrán, m., Muñoz, K., Roa, S., Rozas, F., . . . Muñoz, M. (2017). Effect of a high-fat diet on cholesterol gallstone formation. *Revista Médica de Chile*, Vol. 145 no.9.
- Dintzis, S., & Treuting, P. (2018). Salivary Glands. En S. Dintzis, & P. Treuting, *Comparative Anatomy and Histology. A Mouse and Human Atlas* (págs. 135-145). Seattle, Estados Unidos: Elsevier Inc.
- Economía, S. d. (2020). *La situación de sobrepeso, obesidad y diabetes ha provocado emergencia económica nacional*. Obtenido de Secretaría de Economía: <https://www.gob.mx/se/articulos/la-situacion-de-sobrepeso-obesidad-y-diabetes-ha-provocado-emergencia-economica-nacional?idiom=es>
- ENSANUT. (2018). *Nutrición*. Obtenido de Encuesta Nacional de Salud: https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_presentacion_resultados.pdf
- Ferrante, A. (2013). Macrophages, fat, and the emergence of immunometabolism. *The Journal of clinical investigation*, 4992-4993.
- Fortoul, T. (2017). *Histología y Biología Celular*. Ciudad de México, México: McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.
- Frigolet, M., & Gutiérrez, R. (2020). The colors of adipose tissue. *Gaceta Médica de México*; 156, 142-149.

- Fujikawa, T., Berglund, E., Patel, V., Ramadori, G., Vianna, C., & Vong, L. (2013). Leptin engages a hypothalamic neurocircuitry to permit survival in the absence of insulin. *Cell Metabolism Vol. 18*, 431-444.
- Fullston, T., EM, O. T., NO, P., MJ, D., M, M., M, C., . . . Michelle, L. (2013). Paternal obesity initiates metabolic disturbances in two generations of mice with incomplete penetrance to the F2 generation and alters the transcriptional profile of testis and sperm microRNA content. *FASEB Journal*, 4224-43.
- Gerbaix, M., Metz, L., Ringot, E., & Courteix, D. (2010). Visceral fat mass determination in rodent: Validation of dual-energy x-ray absorptiometry and antropométrica techniques in fat and lean rats. *Lipids Health and Disease*, 9-140.
- González, A., Chavéz, J., Elizondo, S., González, A., León, J., & Ochoa, C. (2018). Metabolic Syndrome and Cardiovascular Disease: A Health Challenge. *Arch Med Res NOV;49*, 516-521.
- Granados, E. (2020). *Estandarización y caracterización de un modelo murino de obesidad inducida por una dieta alta en grasas para su uso en investigación básica*. Ciudad de México, México: Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hai-Yan, W., Cheng, Y., Jin, L.-Y., Zhou, Y., Pang, H.-Y., Zhu, H., . . . Huang, H.-F. (2021). Paternal obesity impairs hepatic gluconeogenesis of offspring by altering Igf2/H19 DNA methylation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 111264.
- Hanson, M., & Gluckman, P. (2014). Early developmental conditioning of later health and disease: physiology or pathophysiology? *Physiological reviews*, 1027-1076.
- Higa, M., Shimabujuro, M., Fukuchi, M., Komiya, I., & Takasu, N. (2002). Atrophic Change of Rat Salivary Gland during Adenovirus-Induced Hyperleptinemia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 675-679.
- Huang, H., Yan, Z., Chen, Y., & Liu, F. (2016). A social contagious model of the obesity epidemic. *Scientific Reports, Nature*, 37961.
- Irie, K., Tomofuji, T., Ekuni, D., Azuma, T., Yoneda, T., Shimazaki, Y., & Morita, M. (2017). Hyperlipidemia is involved in apoptosis in rat submandibular glands. *Archives of Oral Biology*, 136-140.
- Ittichaichoen, et. al. (2017). Impaired mitochondria and intracellular calcium transients in the salivary glands of obese rats. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 42, 420-429.
- Iyengar, N., Gucalp, A., Dannenberg, A., & Hudis, C. (2016). Obesidad y Mecanismos del Cáncer: Microambiente Tumoral e Inflamación. *Diario de*

oncología clínica: diario oficial de la Sociedad Estadounidense de Oncología Clínica, 34 (35), 4270-4276.

- Jean-Pierre, D., Couillard, C., Gagnon, J., Bergeron, J., Leon, A., Rao, D., . . . Bouchard, C. (2000:20). Race, visceral adipose tissue, plasma lipids, and lipoprotein lipase activity in men and women. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 1932-1938.
- Kahn, B., Thierry, A., Cring, D., & Herdie, D. (2005). AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell metabolism*, 1(1), 15-25.
- Kelishadi, R., Mortazavi, S., Hossiein, T., & Poursafa, P. (2010). Association of cardiometabolic risk factors and dental caries in a population based sample of youths. *Diabetol metab Syndr*, 2:22.
- Kolodziej, e. (2017). Oxidative Modification in the Salivary Glands of High Fat-diet Induced Insulin Resistant rats. *Frontieres in Physiology*, Vol.8, 20.
- Lacroix, M., Gaudichon, C., & Martin, A. (2004). A long term high-protein diet markedly reduces adipose tissue without major side-effects in Wistar male rats. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 934-942.
- Lam, T., Gutierrez-Juarez, R., Pocai, A., & Rossetti, L. (2005). Regulation of blood glucose by hypothalamic pyruvate metabolism. *Science*, 943-947.
- Lamby, C., Gómez, O., & Lorenza, J. (2013). La α -amilasa salival: relación con la caries dental y la salud en general. *Universiad Odontológica. Dossier Caries Dental: Investigación Clínica y Epidemiológica*, 93-102.
- Lamy, E., Neves, S., Ferreira, J., Rodrigues, L., Da Costa, G., Cordeiro, C., . . . Capela e Silva, F. (2018). Effects of hyperleptinemia in rat saliva composition, histology and ultrastructure of the major salivary glands. *Archives of Oral Biology*, 1-12.
- Lasisi, T., Shittu, S., & Alada, A. (2018). Re-establishing normal diet following high fat diet-induced obesity reverses the altered salivary composition in Wistar rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 2-10.
- Li, R., Zhang, S.-Y., & Lam, T. (2020). Interaction of glucose sensing and leptin action in the brain. *Mol Metab Sep*; 39, Sep; 39: 101011.
- MacCannell, A., Futers, S., Whitehead, A., Morán, A., Witte, K., & Roberts, L. (2021). Sexual dimorphism in adipose tissue mitochondrial function and metabolic flexibility in obesity. *International Journal Of Obesity*; 45(8), 1773-1781.
- Marcelo, S., & Miguel, C. (2012). Epigenética y diabetes: El rol de las DPP-4. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 169-174.

- Marousez, L., Lesage, J., & Eberlé, D. (2019). Epigenetics: Linking Early Postnatal Nutrition to Obesity Programming? *Nutrients*, 2966.
- Matczuk, e. a. (2016). Insulin Resistance and Obesity Affect Lipid Profile in the Salivary Glands. *Journal of Diabetes Research*. , 9.
- Mesquita, I., Antonioli, L., Cittolin-Santos, G., & German, F. (2018). distinct metabolic profile according to the shape of the oral glucose tolerance test curve is related to whole glucose excursion: a cross-sectional study. *BMC endocrine disorders*, 18(1), 56.
- Modéer, T., Blomberg, C., Wondimu, B., Julihn, A., & Marcus, C. (2010). Association between obesity, flow rate of whole saliva, and dental caries in adolescents. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 2367-2373.
- Mohsen, I. (2009). Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obesity Reviews*. vol. 11, 11-18.
- Mohsen, I. (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obesity Reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 11-18.
- Mozaffari, M., Abdelsayed, R., Zakhary, I., El-Salanty, M., Liu, Y., Wimborne, H., & El-Marakby, A. (2011). Submandibular Gland and Caries Susceptibility in the Obese Zucker Rat. *Journal Oral Pathology Medical*, 2-8.
- Muhammad, A.-G., Tamam, A.-G., Nibal, A., & Defronto, R. (2008). One-hour plasma glucose concentration and the metabolic syndrome identify subjects at high risk for future type 2 diabetes. *Diabetes care*, 31(8), 1650–1655.
- Novelli, E., Diniz, Y., Galhardi, C., Ebaid, G., Rodríguez, H., Mani, F., . . . Novelli, J. (2007). Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Laboratory animals*, 111-119.
- OCDE. (2017). *Obesity Upday Better Policiers for Better Lifes*. Obtenido de Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos: <https://www.oecd.org/health/obesityupdate.htm>
- OCDE. (2019). La pesada carga de la obesidad. La economía de la prevención. *Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos*, . <https://www.oecd.org/mexico/Heavy-burden-of-obesity-Media-country-note-MEXICO-In-Spanish.pdf>.
- OFICIAL, D. (22 de Agosto de 2001). *NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso*. Obtenido de DIARIO OFICIAL DEL GOBIERNO DE MÉXICO: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf
- Oliveira, S., Pai-Silva, M., Martínez, P., Lima, A., Campos, D., Leopoldo, A., . . . Cicogna, A. (2010). Diet-induced obesity causes metabolic, endocrine and

- cardiac alterations in spontaneously hypertensive rats. *MedSciMonit* 16(12), BR367-373.
- OMS. (2021). *Obesidad y Sobrepeso*. Obtenido de Organización Mundial de la Salud: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- O'Reilly, J., & Reynolds, R. (2013). The risk of maternal obesity to the long-term health of the offspring. *Clinical endocrinology*, 9-16.
- Parlee, S., Ormond, A., & MacDougald. (2014). Maternal nutrition and risk of obesity in offspring: The Trojan horse of developmental plasticity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Molecular Basis of Disease*, 495-506.
- Pereira, S., Cline, D., Glavas, M., Covey, S., & Kieffer, T. (2021). Tissue-Specific Effects of Leptin on Glucose and Lipid Metabolism. *Endocrinology Rev.* 42 (1), 1-28.
- Poret, J., Gaudet, D., Douglas, B., & Primeaux, S. (2021). Sex differences in markers of metabolic syndrome and adipose tissue inflammation in obesity-prone, Osborne-Mendel and obesity-resistant, S5B/PI rats . *Life Sciences* 273, 119290.
- Qiong, W., Tao, C., Gupta, R., & Scherer, P. (2013). Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nature medicine*, 1338-1344.
- Roa, I., & Del Sol, M. (2018). Obesity, salivary glands and oral pathology. *Colombia Medica*, 280-287.
- Rodrigues, L., Mouta, R., Costa, A., pereira, A., Capela e Silva, F., Amado, F., . . . Lamy, E. (2015). Effects of high-fat diet on salivary a-amylase, serum parameters and food consumption in rats. *Archives of oral Biology*, 60, 854-862.
- Salamonowicz, M., Zalewska, A., & Maciejczyk, M. (2019). Oral consequences of obesity and metabolic syndrome in children and adolescents. *Dental and medical problems*, 97-104.
- Samuelsson, A., et. al. (2008). Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. *Hypertension*, 51, 383-392.
- Sánchez, P. (2013). La saliva como fluido diagnóstico. *Educación Continuada en el Laboratorio Clínico*, 93-108.
- Schapher, M., Wendler, O., Groschl, M., Schafer, R., Iro, H., & Zenk, J. (2009). Salivary leptin as a candidate diagnostic marker in salivary gland tumors. *Clinical Chemistry*, 914-922.

- Sermondade, N. et. al. (2013). BMI in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis. *Hum Reprod Update*;19(3), 221-231.
- Sheau-Fang, N., Lin, R., Laybutt, R., Barres, R., Owens, J., & Morris, M. (2010). Chronic high-fat diet in fathers programs beta-cell dysfunction in female rat offspring. *Nature*, 963-6.
- SIVEPAB. (2015). *Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales*. Obtenido de SIVEPAB: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/212323/SIVEPAB-2015.pdf>
- Speakman, J., Hambly, C., Mitchell, S., & Elbieta, K. (2008). Contribución de los modelos animales al estudio de la obesidad. *The International Journal of Laboratory Animal Science and Welfare*, 413-432.
- Strakovsky, R., Huang, W., Engeseth, N., Flws, J., Helferich, W., Pan, Y., & Lezmi, S. (2015). Developmental Bisphenol A (BPA) exposure leads to sex-specific modification of hepatic gene expression and epigenome at birth that may exacerbate high-fat-diet-induced hepatic steatosis. *Toxicol Appl Pharmacol*, 101-112.
- Tatsua, K., Michael, A., & Rosario, S. (2021). Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, C375-C391.
- Touger, D., & Mobley, C. (2003). Position of the American Dietetic Association: oral health and nutrition. *Journal American Dietetic Association*, 615-625.
- Unamuno, X., Gómez, J., Rodríguez, A., Becerril, S., Fruhbeck, G., & Catalán, V. (2018). Adipokine dysregulation and adipose tissue inflammation in human obesity. *Stiching European Society for Clinical Investigation Journal Foundation*, 48:e12997.
- Van, H., Reynisdóttir, S., Eriksson, P., Thorne, A., Hoffstedt, J., Lonngvist, F., & Arner, P. (1998). Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women. *Diabetes*, 47(6), 913-917.
- Vega, G., & Rico, M. (2019). Tejido adiposo: función inmune y alteraciones inducida por obesidad. *Inmunología*, Vol. 66 Núm. 3.
- Virto L, et al. (2017). Obesity and periodontitis: An experimental study to evaluate periodontal and systemic effects of comorbidity. *Journal Of Periodontology*, 176-185.
- Von Diemen, V., Neubarth, E., & Manoel, M. (2006). Experimental model to induce obesity in rats. *Acta cirurgica brasileira*, 425-429.
- Wang, Q., Tao, C., Gupta, r., & Scherer, P. (2013). Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nature Medicine*, 1338–1344.

- Weisberg, S., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R., & Anthony, F. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation*, 117(12), 1796-1808.
- Wilson, R., & Messaoudi, I. (2015). The impact of maternal obesity during pregnancy on offspring immunity. *Molecular Cell Endocrinol*, 430(1-2), 134-142.
- Wolf, G. (2002). Glucocorticoids in adipocytes stimulate visceral obesity. *Nutrition Reviews*, 60(5), 148-151.
- Zeigler, C., Persson, R., Wondimu, B., Marcus, C., Sobko, T., & Modéer, T. (2012). Microbiota in the Oral Subgingival Biofilm Is Associated With Obesity in Adolescence. *Pediatric Obesity*, 17(2), 157-164.
- Zhang, Y., Shi, Y., Rassoulzadegan, M., Tuorto, F., & Chen, Q. (2019). Sperm RNA code programmes the metabolic health of offspring. *Nat Rev Endocrinol*, 15(10), 489-498.