



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**TESIS**

**“ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE APELINA / APLNR EN TEJIDO CARDIACO Y TEJIDO ADIPOSO  
VISCERAL DE RATAS F1 DE LA CEPA WISTAR DESCENDIENTES DE UN MODELO DE  
OBESIDAD ALIMENTADAS CON UNA DIETA RICA EN GRASAS TRATADAS CON EL  
FLAVONOIDE (-)-EPICATEQUINA”**

**Que para optar por el grado de:  
Maestro en Ciencias**

**Presenta:**

Médico Especialista Rogelio Edgar Castillo Ramírez

**Tutora principal:**

Dra. en C. Ileana Patricia Canto Cetina

Unidad Periférica de Investigación en Obesidad, Facultad de Medicina, Universidad Nacional  
Autónoma de México

**Comité tutorial:**

Dr. Juan Pablo Méndez Blanco

Unidad Periférica de Investigación en Obesidad, Facultad de Medicina, Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dra. María Elizabeth Tejero Barrera  
Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN)

Ciudad de México, Abril de 2024



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**

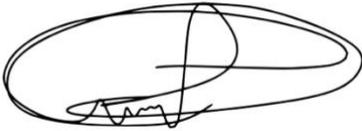
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.

**TÍTULO DE LA TESIS: ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE APELINA / APLNR EN TEJIDO CARDIACO Y TEJIDO ADIPOSEO VISCERAL DE RATAS F1 DE LA CEPA WISTAR DESCENDIENTES DE UN MODELO DE OBESIDAD ALIMENTADAS CON UNA DIETA RICA EN GRASAS TRATADAS CON EL FLAVONOIDE (-)-EPICATEQUINA”**

**Grado por el que se opta: Maestro en Ciencias**

**FIRMAS:**



ROGELIO EDGAR CASTILLO RAMIREZ

---

NOMBRE Y FIRMA DEL ALUMNO



DRA. ILEANA PATRICIA CANTO CETINA

---

NOMBRE Y FIRMA DEL TUTOR



DR. CARLOS ALBERTO AGUILAR SALINAS

---

NOMBRE Y FIRMA DEL RESPONSABLE DE LA ENTIDAD  
Y/O CAMPO DISCIPLINARIO

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT), por haberme otorgado apoyo financiero para la realización de mis estudios de maestría.

A Jimena Munguía Salazar, alumna de posgrado de la maestría en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por su apoyo y contribución con los datos obtenidos de su trabajo de investigación, mismos que fungieron como referencia en una parte del análisis del presente trabajo.

Este trabajo fue parcialmente apoyado por el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación SEP-CONACYT, Convocatoria de Investigación Científica Básica 2017-2018, CONAHCyT México, bajo el apoyo A1-S-9740.

## ÍNDICE GENERAL

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	8
1.1 Programación fetal.....	9
1.2 Efecto de la obesidad materna.....	10
1.3 Efecto de la dieta en la descendencia.....	12
<b>2. APELINA Y SISTEMA APELINÉRGICO</b> .....	13
2.1 Efectos de la a pelina.....	14
2.2 Expresión del sistema apelinérgico.....	15
<b>3. EPICATEQUINA</b> .....	19
3.1 Efectos de la epicatequina en la composición corporal.....	19
3.2 Efectos de la epicatequina en el corazón.....	22
<b>4. EFECTOS DE LA EPICATEQUINA SOBRE LA EXPRESIÓN DEL SISTEMA APELINÉRGICO ...</b> .....	23
<b>5. JUSTIFICACIÓN</b> .....	25
<b>6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	26
<b>7. OBJETIVO GENERAL</b> .....	26
<b>8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	26
<b>9. HIPÓTESIS</b> .....	27
<b>10. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	28
10.1 Modelo animal.....	28
10.2 Extracción de RNA.....	31
10.3 Análisis de expresión génica.....	31
<b>11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	32
11.1 Tamaño de la muestra.....	32
<b>12. RESULTADOS</b> .....	35
<b>13. DISCUSIÓN</b> .....	43
<b>14. CONCLUSIONES</b> .....	49
<b>15. REFERENCIAS</b> .....	51

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1.</b> Parámetros bioquímicos entre grupos de estudio tratados y no tratados con epicatequina.....	20
<b>TABLA 2.</b> Determinaciones de peso y grasa corporal en diferentes compartimentos corporales entre diferentes grupos con uno o dos estímulos.....	21
<b>TABLA 3.</b> Cuantificación y pureza del RNA total obtenido del tejido cardiaco de ratas Wistar descendientes de cada grupo experimental.....	35
<b>TABLA 4.</b> Cuantificación y pureza del RNA total obtenido del tejido adiposo de ratas Wistar descendientes de cada grupo experimental .....	36

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Estructura de la (-)-epicatequina (Epi).....	18
<b>FIGURA 2.</b> Diferencias en peso corporal y grasa total entre un grupo control y dos grupos intervenidos con epicatequina.....	20
<b>FIGURA 3.</b> Cronología del estudio.....	30
<b>FIGURA 4.</b> Electroforesis de RNA de tejido cardiaco .....	37
<b>FIGURA 5.</b> Electroforesis de RNA de tejido adiposo.....	37
<b>FIGURA 6.</b> RT-qPCR. Expresión de <i>Apln</i> y <i>Aplnr</i> de dos muestras tomadas al azar.....	38

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

<b>GRÁFICA 1A.</b> Expresión de <i>Apln</i> en tejido cardiaco .....	39
<b>GRÁFICA 1B.</b> Expresión de <i>Aplnr</i> en tejido cardiaco .....	40
<b>GRÁFICA 2A.</b> Expresión de <i>Apln</i> en tejido adiposo .....	41
<b>GRÁFICA 2B.</b> Expresión de <i>Aplnr</i> en tejido adiposo.....	42

## ABREVIATURAS

ACC	Acetil-Coenzima A Carboxilasa
AMPK	Cinasa de monofosfato de adenosina
AMPK $\alpha$	Cinasa de monofosfato de adenosina, subunidad alfa
AKT	Proteína cinasa B
ANP	Péptido natriurético auricular
APLN	Apelina
APLNR	Receptor de Apelina
<i>Apln</i>	Gen de Apelina
<i>Aplnr</i>	Gen del receptor de Apelina
ATGL	Lipasa Adipocítica de Triglicéridos
AT1R	Receptor de angiotensina tipo 1
$\beta$ -MHC	Cadena pesada de la beta miosina
BNP	Péptido natriurético cerebral
C	Dieta control o descendiente de madre control
C/EBP $\alpha$	Proteína potenciadora de unión a CCAAT
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	DNA complementario
DPN	Días posnatales
Epi o E	(-)-epicatequina
eNOS	Sintasa de óxido nítrico endotelial
g	gramos
GC	Glucocorticoides
GH	Hormona del crecimiento
GLUT4	Transportador de glucosa tipo 4
GPER	Receptor de estrógeno ligado a proteína G
HFD	Dieta alta en grasas
HOMA-IR	Evaluación del modelo de homeostasis (Homeostasis Model Assessment)
IMC	Índice de Masa Corporal
Kcal	kilocalorías
LVESP	Presión de fin de sístole del ventrículo izquierdo
MF2	Proteína mitocondrial MF2
MO	Modelo materno de obesidad
mTOR	Objetivo de rapamicina de los mamíferos
NF-kB	Factor nuclear kappa B
PGC1 $\alpha$	Proteína 1 $\alpha$ coactivadora del receptor activado por proliferador de peroxisomas
PGC1 $\beta$	Proteína 1 $\beta$ coactivadora del receptor activado por proliferador de peroxisomas
PI3K	Fosfatidil inositol 3 cinasa
PPAR $\gamma$	Receptor activado por proliferador de peroxisomas gamma
PXR	Receptor X de pregnano
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
RT-qPCR	Reacción de la cadena de polimerasa con transcriptasa inversa tiempo real
ROS	Especies reactivas de oxígeno
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa

## RESUMEN

La obesidad materna condiciona alteraciones metabólicas en la descendencia, así como mayor incidencia enfermedad cardiovascular. El tipo de nutrición que reciban las crías en la etapa posnatal, podría potenciar las alteraciones condicionadas por la programación fetal. La expresión y activación del sistema apelinérgico (APLN/APLNR), ha demostrado tener efectos benéficos al hacer reversibles las alteraciones asociadas a la obesidad. El flavonoide (-)-epicatequina ha demostrado también sus efectos benéficos sobre estas alteraciones, modificando la expresión del sistema apelinérgico y compartiendo algunas vías efectoras con el sistema apelinérgico.

En este estudio, se evaluó la expresión de *Apln* / *Aplnr* en el tejido cardíaco y tejido adiposo visceral de ratas F1 de la cepa Wistar descendientes de madres obesas (MO) alimentadas con dieta alta en grasas (HFD) tratadas con el flavonoide (-)-epicatequina (Epi o E).

En tejido cardíaco, el grupo MO + HFD + E , mostró incremento significativo en la expresión de *Apln* y del receptor *Aplnr*. Por su parte, el receptor *Aplnr* en tejido cardíaco, además de su incremento en el grupo MO + HFD + E, se observó también incrementado de forma destacable en el grupo HFD + E.

En tejido adiposo, se observó un incremento destacable en la expresión de *Apln/Aplnr* en el grupo MO + E, aunque sin significancia estadística con el resto de los grupos. En el grupo MO + HFD + E, la expresión de *Aplnr* se observó marcadamente disminuida respecto al resto de los grupos intervenidos con Epi. La Epi podría representar una intervención terapéutica de interés con efectos protectores cardíacos y metabólicos para los descendientes de madres con obesidad, que está expuestas a una dieta obesogénica alta en grasas.

## 1. INTRODUCCIÓN

La obesidad representa un desafío global en materia de salud pública, ya que las complicaciones a las que se asocia afectan considerablemente la calidad y esperanza de vida de la población. De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2022, la prevalencia de obesidad para ese año en ambos sexos fue del 36.9%, siendo mayor en mujeres (41%) que en hombres (32.3%) (Campos-Nonato y cols., 2023). De todos los grupos de edad afectados, las mujeres en edad reproductiva (20 a 49 años) representan un segmento poblacional de interés cuya prevalencia de obesidad continúa en incremento de forma importante (Campos-Nonato y cols., 2023).

La obesidad se caracteriza por un exceso de tejido adiposo, cuyo crecimiento se ve favorecido por un aumento excesivo en el almacenamiento energético (Purnell y cols., 2023). Los adipocitos tienen la capacidad de expandirse a través de dos mecanismos: hiperplasia e hipertrofia. La hipertrofia particularmente favorece el desarrollo de hipoxia tisular local debido al rápido incremento en el tamaño de las células y las altas demandas de oxígeno que no son alcanzadas por nuevos vasos sanguíneos en formación, favoreciendo aumento del estrés oxidativo e inflamación (Choe y cols., 2016).

Se ha descrito que la presencia de comorbilidades que acompañan a la obesidad tiene diversos factores fisiopatológicos en común, entre los que destacan resistencia a la insulina, desregulación en la secreción de diversas adipocinas e incremento de citocinas proinflamatorias que favorecen un proceso inflamatorio crónico de bajo grado (Avgerinos y cols., 2019).

## 1.1 Programación Fetal

Las madres con obesidad tienen mayor riesgo de presentar complicaciones asociadas al embarazo y al parto, y sus descendientes tienen mayor riesgo de padecer obesidad desde edades tempranas (Reynolds y cols., 2010; Vasudevan y cols., 2011); lo anterior es debido a los cambios adaptativos al entorno metabólico al que se expone el feto durante su desarrollo, proceso denominado programación fetal (Gluckman y cols., 2005; Reynolds y cols., 2019).

Se han descrito diversos mecanismos que intervienen en la programación fetal (Reynolds y cols., 2019; King y cols., 2020), entre los que destacan los siguientes:

- a) Alteración de la barrera placentaria: Dada por la remodelación de las arterias espirales que condiciona daño mecánico e hipoxia (Cobellis y cols., 2007).
- b) Exposición incrementada a glucocorticoides (GC): El estrés oxidativo y la alteración de la barrera placentaria puede favorecer incremento de los GC circulantes fetales, mismos que podrían favorecer retraso del crecimiento, intolerancia a la glucosa y daño endotelial. Esto podría favorecer el desarrollo de resistencia a la insulina e hipertensión arterial en la etapa adulta.
- c) Alteraciones del eje hipotalámico-hipófisis-adrenal: La desnutrición puede alterar la actividad de este eje, disminuyendo la retroalimentación negativa y aumentando la producción de GC por las glándulas suprarrenales fetales.
- d) Alteraciones durante la organogénesis: La macrosomía fetal es más común en madres con obesidad (incluso en ausencia de diabetes) en comparación con madres sin obesidad, destacando como mecanismos el incremento en la disponibilidad de nutrientes, la resistencia a la insulina materna y el consecuente estado de hiperinsulinemia fetal (Jensen

y cols., 2003). El rápido crecimiento fetal puede aumentar aceleradamente la demanda de oxígeno y nutrientes del que la placenta es capaz de aportar, condicionando mayor estrés oxidativo (Reynolds y cols., 2013). El feto tiene baja capacidad antioxidante, por lo que un exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS) podría afectar el desarrollo fetal normal (Dennery y cols., 2010).

e) Alteraciones epigenéticas: La regulación por mecanismos epigenéticos comienza a establecerse desde el desarrollo temprano y guarda relación con variables como el IMC, el entorno metabólico y el entorno nutricional materno. Se han identificado algunos mecanismos predominantes como son: metilación del DNA, modificación de histonas y silenciamiento génico asociado a RNA no codificante (Handy y cols., 2011).

## **1.2 Efecto de la obesidad materna**

Los estudios realizados en modelos animales han demostrado que la obesidad materna durante la gestación es un determinante importante de alteraciones metabólicas en la descendencia, caracterizada por un aumento de tejido adiposo visceral, de triglicéridos séricos, de niveles de leptina, de insulina, así como mayor resistencia a la insulina (Nathanielsz y cols., 2013; de los Santos y cols., 2020). Dichas alteraciones metabólicas pueden ser parcialmente reversibles mediante una dieta control, en comparación con una dieta alta en grasas posterior al destete (Zambrano y cols., 2010).

De igual forma, Vega y cols., (2015) describieron que la obesidad materna se asoció con un incremento en el porcentaje de grasa corporal, niveles de leptina y triglicéridos de la

descendencia en el día 36 posnatal, siendo estas alteraciones atenuadas si las madres eran sometidas a ejercicio antes y durante la gestación.

Estos efectos de la obesidad materna sobre la descendencia pueden tener variaciones con base en el sexo de la descendencia, como se observó en otro estudio realizado por Litzenburger y cols. (2020), en el que se describieron dos fases de programación metabólica dependiente del sexo de las crías de madres con obesidad: Una fase temprana (21 días posnatal) en la que en las hembras, se observó mayor cantidad de tejido adiposo corporal total, mayor expresión del RNAm de IL-1 y metaloproteinasa-12, y expresión disminuida del gen de la leptina en comparación con los machos. En una fase de análisis tardía (120 días posnatal), se observó mayor cantidad de tejido adiposo total en las hembras, sin embargo, el tamaño de los adipocitos y la expresión de los genes de IL-1 y metaloproteinasa-12, disminuyeron hasta en un 80% en comparación con los machos, que sugirió menor intensidad de un proceso inflamatorio de bajo grado presente en la obesidad. Estos cambios se observaron posterior a que todas las crías fueron alimentadas con una dieta estándar hasta el día 56 posnatal, destacando el efecto determinante de la obesidad mediada por programación (Litzenburger y cols., 2020).

En humanos se ha demostrado la asociación que existe entre la obesidad materna y la mayor incidencia de cardiopatías congénitas y enfermedad cardiovascular desde la etapa neonatal hasta la etapa adulta (Kankowski y cols., 2022; Matuszak y cols., 2024).

Sin embargo, los efectos negativos que tiene la obesidad materna, persisten de forma independiente al tipo de dieta que tenga la descendencia posterior al destete, como lo mostró un estudio en el que las crías descendientes de un modelo materno de obesidad, presentaron mayor cantidad de grasa corporal total, gonadal e epididimaria en comparación con los descendientes de madres control en los días 110, 450 y 650 posnatales, posterior a que todas las crías fueron alimentadas con una dieta control (Rodríguez-González y cols., 2015).

### **1.3 Efectos de la dieta en la descendencia**

Además de los efectos demostrados de la obesidad materna sobre la descendencia (obesidad por programación), el tipo de nutrición que reciban las crías en la etapa posnatal podría comportarse como un segundo golpe o estímulo, y potenciar las alteraciones ya condicionadas por la programación fetal. Las crías de ratas con obesidad que además son alimentadas con una dieta alta en grasas entre la semana 8 y 16 posterior al destete, muestran mayor cantidad de tejido adiposo, leptina sérica y resistencia a la insulina en comparación con las crías de ratas con obesidad que son alimentadas con una dieta control en esta misma temporalidad, observándose el efecto aditivo de la dieta como un segundo estímulo para el desarrollo de estas alteraciones (White y cols., 2009).

En otro estudio se obtuvieron resultados similares, al observarse que las crías de madres con obesidad, que además fueron alimentadas con dieta alta en grasas (grupo con doble estímulo) entre los días 21 y 110 posnatales, mostraron mayor cantidad de grasa corporal e índice de adiposidad, así como mayores niveles séricos de glucosa, insulina, leptina y triglicéridos, al

compararse con las crías de madres con obesidad que recibieron una dieta control. Estos cambios se observaron también al comparar el grupo de doble estímulo con el grupo de crías de madres control que solo recibieron dieta alta en grasas como estímulo aislado (Rodríguez-González y cols., 2023).

El tejido adiposo hipertrófico de madres con obesidad y de sus descendientes, presenta expresión alterada de factores de crecimiento y de citocinas proinflamatorias, así como de proteínas específicas secretadas por el tejido adiposo denominadas adipocinas, lo que condiciona a diversas alteraciones metabólicas (Lehr y cols., 2012). Una de las adipocinas cuya secreción se encuentra alterada en la obesidad y que ha sido más recientemente estudiada es la apelina (APLN) (Mehri y cols., 2023).

## **2. Apelina y sistema apelinérgico**

La APLN es un péptido que se une a su receptor (APLNR o APJ) para ejercer sus funciones (Tatemoto y cols., 1998). En humanos, el gen *Apln* se encuentra en el cromosoma Xq25-26.1 y codifica para una preproteína de 77 aminoácidos (preproapelina), la cual es escindida para dar lugar a una proproteína de 55 aminoácidos (proapelina) y finalmente diferentes péptidos biológicamente activos: apelina-32, apelina-17, apelina-13 y Pyr-apelina-13 (Girault-Sotias y cols., 2021).

Por su parte, el gen del receptor de apelina *Ap1nr*, se encuentra en el cromosoma 11q12 y codifica para una proteína de 380 aminoácidos, siendo parte de la familia de receptores acoplados a proteína G que poseen en su estructura 7 dominios transmembrana. Fue descubierto en 1993 sin conocer su función ni sus potenciales ligandos, por lo que por algunos años fue categorizado como

un receptor huérfano (O'Dowd y cols., 1993). APLNR tiene una estructura similar al receptor de Angiotensina tipo 1 (AT1R) compartiendo hasta 31% de homología, sin embargo, la angiotensina II no tiene capacidad de unión al mismo (O'Carroll y cols., 2013).

## **2.1 Efectos de la apelina**

La APLN es secretada predominantemente por el tejido adiposo, pero también en otros sitios como el corazón, pulmones, riñones, ovarios, testículos, sistema nervioso central y células endoteliales (Mehri y cols., 2023). La APLN al unirse a su receptor, participa en diversos procesos fisiológicos como la regulación de los líquidos corporales, la presión arterial, la respuesta metabólica al estrés, el control del gasto energético, el metabolismo de los lípidos/glucosa, así como la función y estructura de tejidos especializados como los adipocitos y las células miocárdicas (Szokodi y cols., 2001; Bertrand y cols., 2015). En el tejido adiposo, la APLN favorece la captación de glucosa de forma no dependiente de insulina mediada por GLUT4, incrementa la biogénesis mitocondrial, potencia la oxidación de ácidos grasos, regula la sensibilidad a la insulina y disminuye la lipólisis y adipogénesis (Li y cols., 2022).

A nivel miocárdico se ha descrito su efecto inotrópico positivo, disminuye el estrés oxidativo, potencia la biogénesis mitocondrial y la oxidación de ácidos grasos y disminuye el desarrollo de remodelación patológica cardíaca e insuficiencia cardíaca. En el endotelio vascular posee efectos vasodilatadores mediados por la fosforilación de eNOS (Ceylan y cols., 2013; Pang y cols., 2023).

Se ha observado en modelos murinos que la administración de APLN favorece la disminución de la adiposidad corporal y los triglicéridos séricos, y por otro lado, favorece el incremento en la temperatura corporal, la oxidación de ácidos grasos y el consumo de oxígeno, por lo cual los

ratones carentes de esta adipocina tienen más adiposidad abdominal y mayores concentraciones séricas de ácidos grasos libres (Yue y cols., 2011; Hanssens y cols., 2016). Debido a estos hallazgos, los efectos benéficos y protectores a nivel metabólico y cardiovascular de la APLN han podido ser mejor comprendidos, por lo que el estudio aquellos factores que pudieran alterar o afectar su expresión y su secreción resultan de alta relevancia. La obesidad y el tipo de dieta son factores que pueden impactar negativamente en la expresión del sistema APLN/APLNR o sistema apelinérgico (Mehri y cols., 2023).

## **2.2 Expresión del sistema apelinérgico**

La expresión tisular de *Apln/Aplnr* puede ser modificada por factores exógenos como la composición de la dieta (García-Díaz y cols., 2007) y el consumo de algunos fitoquímicos naturales (p.e., (-)-epicatequina) (de los Santos y cols., 2023). Estos a su vez pueden tener efecto sobre algunos factores endógenos que modifican la expresión de *Apln/Aplnr* como son la hiperinsulinemia (Boucher y cols., 2005), la hormona del crecimiento (GH) (Kralisch y cols., 2007), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) (Daviaud y cols., 2006), e incluso componentes de la pared bacteriana como el lipopolisacárido (Geurts y cols., 2011).

En un estudio realizado por Mehri y cols. (2019), se observó una menor expresión del RNAm de apelina en tejido ovárico de crías de ratas que habían sido alimentadas con una dieta alta en grasas durante la gestación, en comparación con crías de ratas control (Mehri y cols., 2019).

Por otro lado, en el tejido adiposo de ratas que son alimentadas con una dieta alta en grasas, se ha observado también incremento en la expresión de *Apln/Aplnr* (García-Díaz y cols., 2007).

De los Santos y cols., (2020) analizaron en ratas macho Wistar el efecto de la obesidad por programación sobre algunos parámetros metabólicos, observando que las crías de madres obesas por una dieta alta en grasas (HFD por sus siglas en inglés “High fat diet”) presentaban mayor cantidad de grasa visceral, mayor tamaño de los adipocitos, aumento en las concentraciones séricas de triglicéridos, leptina, insulina y resistencia a la insulina en comparación con las crías descendientes de madres control.

Posteriormente, el mismo grupo de investigación sugirió que esas alteraciones metabólicas podrían ser secundarias a cambios en la expresión de *Apln/Aplnr* en el tejido adiposo visceral de las ratas de 245 días posnatales obesas por programación, lo cual conduce a una desregulación en las vías intracelulares de la lipólisis, lipogénesis y adipogénesis (de los Santos y cols., 2023).

Con respecto a la expresión del sistema apelinérgico en humanos, nuestro grupo de investigación analizó las proteínas y la expresión de RNAm de APLN y APLNR en tejido adiposo visceral de individuos con obesidad clase 3 con y sin hipertensión. Se observó una mayor expresión tanto a nivel de RNAm como de la proteína de APLN en los sujetos con hipertensión, en contraste, se observó en este mismo grupo disminución de la expresión del RNAm de *Aplnr*, así como una menor fosforilación de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) en comparación el grupo sin hipertensión. Se concluyó que la disminución de la actividad del sistema apelinérgico en conjunto con la menor fosforilación de la eNOS podría participar en el desarrollo de hipertensión y enfermedad cardiovascular en el contexto de la obesidad (Cano-Martínez y cols., 2023).

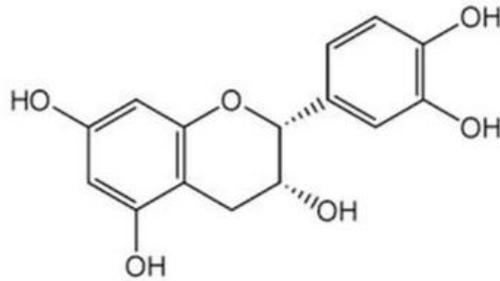
### 3. Epicatequina

De los factores exógenos previamente mencionados capaces de modificar la expresión del sistema apelinérgico, se encuentran algunos fitoquímicos naturales como los polifenoles, cuya familia más grande está representada por una clase de moléculas denominadas flavonoides, mismos que en los últimos años han sido estudiados como coadyuvantes para tratar las complicaciones que genera la obesidad (Meydani & Hasan, 2010).

Uno de los flavonoides mejor estudiados ha sido la (-)-epicatequina (Epi), que ha demostrado tener efectos favorables sobre la composición corporal ya que disminuye el porcentaje de adiposidad, reduce la presión arterial a través de vasodilatación mediada por la fosforilación de eNOS, aumenta la capacidad oxidativa y disminuye la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Ramírez-Sánchez y cols., 2010; de los Santos y cols., 2019; de los Santos y cols., 2020).

La Epi se encuentra de forma natural en alimentos como el té, el cacao, las uvas, manzanas y cerezas entre otras frutas (Actis-Goretta y cols., 2012; Ma y cols., 2018). Se compone estructuralmente por dos anillos aromáticos y un anillo heterocíclico que contiene oxígeno (Figura 1), además de poseer grupos hidroxilo que le confieren la capacidad de reaccionar con especies reactivas de oxígeno (Shay y cols., 2015). La Epi se mantiene estable en el pH ácido gástrico y es altamente absorbida en el tracto gastrointestinal entre 6 a 8 horas posteriores a su ingesta oral, con una biodisponibilidad por vía oral de hasta el 78%. Es posteriormente metabolizada tanto en las células intestinales como en el hígado a través de reacciones de fase II, principalmente a través de glucoronidación y metilación. La eliminación es predominantemente

por la vía renal hasta en un 70%, identificándose hasta 20 diferentes metabolitos de Epi en orina, y el resto es eliminado a través de las heces (Qu y cols., 2021).



**Figura 1.** Estructura de la (-)-epicatequina (Portilla-Martínez y cols., 2022).

Se ha demostrado que Epi interactúa con receptores como el receptor estrogénico ligado a proteína G (GPER), y el receptor X de pregnano (PXR) que es un receptor nuclear, sin embargo, estos no explican la totalidad de todos los efectos conocidos en diferentes tejidos de este flavonoide, por lo que podrían existir otros receptores con los que podría unirse. Respecto a este punto, se ha demostrado que la Epi puede comportarse como un ligando de APLNR, estimular la vía PI3K/AKT y de la  $\beta$ -arrestina. Esta última vía ejerce un efecto regulador negativo sobre este receptor (Portilla-Martínez y cols., 2022). Así mismo, se han descrito otros mecanismos de acción compartidos con la vía APLN/APLNR como son incremento de la vía MF2, PGC1 $\alpha$ , PGC1 $\beta$ , AMPK y mTOR (Castan-Laurell y cols., 2012; Attané y cols., 2012; Vinel y cols., 2018), así como la disminución en la expresión del factor de transcripción NF-kB y el TNF $\alpha$ , disminuyendo la respuesta inflamatoria crónica presente en padecimientos como la obesidad (Vázquez-Prieto y cols., 2012).

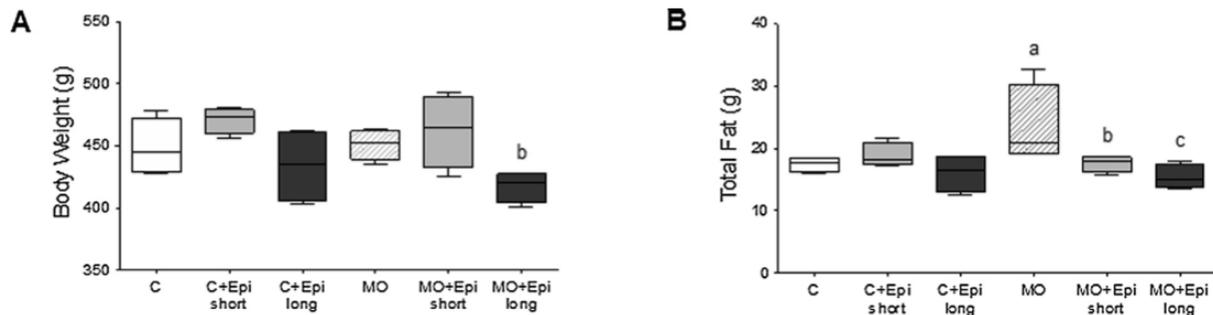
Por otra parte, se ha descrito que la Epi es un mimético del ejercicio. Nogueira y cols., (2011) reportaron que la administración de Epi a una dosis de 1mg/kg dos veces al día, a dos grupos de ratas macho adultas de 1 año de edad (grupo con ejercicio y sin ejercicio), en comparación con dos grupos análogos que solo recibieron agua como vehículo (grupos sin Epi), fue capaz de aumentar en forma significativa el rendimiento aeróbico hasta un 50%, así como una mayor resistencia a la fatiga muscular. Asimismo, se observó un aumento significativo en los grupos tratados con este flavonoide de los niveles de proteínas de los complejos de fosforilación oxidativa, del volumen mitocondrial, así como la capilaridad del músculo esquelético al analizarse cortes histológicos.

En forma importante, la combinación de Epi + ejercicio resultó en mayores beneficios que la administración aislada de Epi, por lo que se concluyó que la Epi sola o en combinación con ejercicio favorece cambios estructurales y metabólicos en el músculo esquelético que aumenta el rendimiento y la resistencia al ejercicio (Nogueira y cols., 2011).

### **3.1 Efectos de la epicatequina en la composición corporal**

Nuestro grupo de investigación analizó el efecto de la obesidad materna en la descendencia cuando las crías son alimentadas con dieta control. Para ello, estudiaron ratas macho Wistar de 110 días posnatales, y se encontró un incremento significativamente mayor del tejido adiposo visceral en la descendencia masculina del grupo de obesidad materna en comparación con la descendencia de madres del grupo control. En forma importante, se observó que la administración de 90 días con Epi fue capaz de disminuir la cantidad total de tejido adiposo en la

descendencia masculina del grupo de obesidad materna en comparación con un grupo de ratas control sin esta intervención, destacando el efecto benéfico de este flavonoide en la obesidad mediada por programación (de los Santos y cols., 2019).



**Figura 2.** Diferencias en peso corporal y grasa total entre un grupo control y dos grupos intervenidos con epicatequina. C = Grupo control, C + Epi short = Grupo control con epicatequina administrada durante 2 semanas, C + Epi long = Grupo control con epicatequina administrada durante 13 semanas (Tomado de: de los Santos y cols., 2019).

De manera similar, en otro estudio realizado por nuestro grupo se encontró que las ratas macho Wistar de 245 días posnatales descendientes de madres obesas presentaban obesidad por programación, y el tratamiento con 15 días con Epi disminuyó en forma significativa la cantidad de tejido adiposo visceral, así como el tamaño de las células del tejido adiposo, esto en comparación con ratones que no recibieron esta intervención. Asimismo, Epi disminuyó los niveles de insulina, leptina y triglicéridos, así como el índice HOMA-IR (de los Santos y cols., 2020) (Tabla 1).

	C n = 8	C + Epi n = 8	MO n = 8	MO + Epi n = 8
Glucosa (mM/L)	0.06 ± 0.77	6.26 ± 0.30	6.45 ± 0.43	6.48 ± 0.47
Insulina (μU/ml)	63.70 ± 17.83	65.00 ± 39.08	136.40 ± 55.20	80.37 ± 32.95
Colesterol (mg/dL)	55.88 ± 10.74	59.25 ± 18.08	56.00 ± 10.34	58.38 ± 12.03
Triglicéridos (mg/dL)	106.10 ± 20.33	104.60 ± 9.28	187.00 ± 41.49	106.10 ± 25.49
Leptina (ng/ml)	10.13 ± 3.54	13.40 ± 6.92	27.78 ± 8,66	18.95 ± 5.59
HOMA-IR	16.72 ± 5.77	17.25 ± 9.98	37.43 ± 14.47	22.34 ± 9.56

**Tabla 1.** Parámetros bioquímicos entre grupos de estudio tratados y no tratados con epicatequina. Valores expresados en media±DE. C = ratas alimentadas con dieta control, C + Epi= ratas alimentadas con dieta control tratadas con Epi, MO = ratas descendientes de madres con obesidad, MO + Epi = ratas descendientes de madres con obesidad tratadas con Epi. (Tomado de: de los Santos y cols., 2020)

Los mecanismos propuestos para la acción que tiene (-)-epicatequina para disminuir el tejido adiposo visceral y mejorar el perfil metabólico, es a través del aumento de la expresión del sistema apelinérgico (*Apln* y *Aplnr*) y la forma fosforilada activa de AMPK $\alpha$ ; asimismo, modifica el nivel de expresión o forma activa de proteínas involucradas en la lipólisis, lipogénesis y adipogénesis en el tejido adiposo retroperitoneal de los descendientes machos de madres obesas (de los Santos y cols., 2023).

En forma adicional, de los Santos y cols., (2022), analizaron el efecto de la (-)-epicatequina en ratas macho Wistar de 110 días posnatales descendientes de madres con obesidad que además recibieron una dieta alta en grasas (modelo con doble estímulo). Los investigadores demostraron que la administración de Epi disminuyó significativamente la cantidad de grasa corporal total y visceral en comparación de los descendientes con las mismas características pero que no recibieron el tratamiento con este flavonoide (Tabla 2).

	<b>C</b> <b>n = 4</b>	<b>CHF</b> <b>n = 4</b>	<b>CHF + Epi</b> <b>n = 4</b>	<b>MO</b> <b>n = 4</b>	<b>MOHF</b> <b>n = 4</b>	<b>MOHF + Epi</b> <b>n = 4</b>
Peso corporal (g)	448.8 $\pm$ 22.6	585.5 $\pm$ 42.3	508.7 $\pm$ 32.4	451.4 $\pm$ 12.1	612.7 $\pm$ 6.3	540.2 $\pm$ 29.3
Grasa total (g)	17.4 $\pm$ 1.1	58.3 $\pm$ 13.4	38.9 $\pm$ 8.1	25.9 $\pm$ 4.6	67.1 $\pm$ 5.4	49.1 $\pm$ 3.0
Grasa retroperitoneal (g)	6.4 $\pm$ 0.7	26.2 $\pm$ 6.1	15.7 $\pm$ 3.7	11.4 $\pm$ 2.3	30.9 $\pm$ 2.8	22.9 $\pm$ 2.0
Grasa gonadal (g)	7.3 $\pm$ 1.1	21.1 $\pm$ 5.8	14.7 $\pm$ 2.5	8.6 $\pm$ 1.8	21.4 $\pm$ 3.0	16.2 $\pm$ 1.4
Grasa mesentérica (g)	2.6 $\pm$ 0.5	7.3 $\pm$ 2.1	5.6 $\pm$ 2.2	3.8 $\pm$ 0.7	9.7 $\pm$ 1.6	6.7 $\pm$ 1.0
Grasa pancreática (g)	0.7 $\pm$ 0.2	2.8 $\pm$ 0.9	2.2 $\pm$ 0.4	1.5 $\pm$ 0.2	4.2 $\pm$ 1.1	2.5 $\pm$ 0.4
Índice de adiposidad visceral (%)	3.9 $\pm$ 0.2	9.9 $\pm$ 2.0	7.6 $\pm$ 1.4	5.7 $\pm$ 1.0	10.9 $\pm$ 0.9	9.1 $\pm$ 0.6

**Tabla 2.** Determinaciones de peso y grasa corporal en diferentes compartimentos corporales entre diferentes grupos con uno o dos estímulos. Valores expresados en media $\pm$ DE. **C + Epi**= ratas alimentadas con dieta control tratadas con Epi, **MO** = ratas descendientes de madres con obesidad, **MO + Epi** = ratas descendientes de madres con obesidad tratadas con Epi. (Tomado de: de los Santos y cols., 2020)

### 3.2 Efectos de la epicatequina en el corazón

Con respecto al efecto de la Epi en el corazón, Yamazaki y cols., (2008), evaluaron los efectos en el corazón de la administración de Epi a una dosis de 1mg/kg/d durante 2 o 10 días, en ratas adultas de 8 semanas de edad posterior a inducirles lesión de tipo isquemia/reperfusión mediante la oclusión por toracotomía de la arteria descendente anterior durante 45 minutos, y posteriormente comparando con un grupo control al que solo se le administró agua como vehículo, sin Epi. Se observó que el grupo que recibió Epi durante 10 días tuvo reducción en el tamaño de la zona de infarto entre 30 al 50% en comparación con el grupo sin Epi. Se observó además que no existieron cambios hemodinámicos significativos, incremento en la actividad de mieloperodixada miocárdica, ni alteraciones en la estructura cardiaca en las ratas que recibieron Epi, demostrándose el efecto cardioprotector de la misma.

También se ha descrito que la administración de Epi puede favorecer la remodelación e hipertrofia de tipo fisiológico, como lo mostró un estudio realizado por de los Santos y cols., (2017), en el que el tratamiento con Epi indujo un aumento significativo en el peso del corazón, el tamaño de las paredes libres y el tamaño de las fibras cardíacas, sin evidencia de fibrosis. La fosforilación de las proteínas PI3K/Akt/mTOR/p70S6K (relacionadas con la hipertrofia fisiológica), fue mayor en el corazón de las ratas tratadas con Epi, y en contraste, se observó disminución significativa de marcadores de hipertrofia cardíaca patológica como el péptido natriurético auricular (ANP), el péptido natriurético cerebral (BNP) y la cadena pesada de beta miosina ( $\beta$ -MHC). Al evaluar los parámetros hemodinámicos, el grupo tratado con Epi mostró hallazgos similares a la adaptación cardiaca en atletas como la disminución de la frecuencia cardiaca, disminución en la presión de fin de sístole del ventrículo izquierdo (LVESP) y mayor capacidad de

relajación (efecto lusitrópico). Estos efectos fueron reversibles tras 4 semanas de la suspensión de la intervención con Epi (de los Santos y cols., 2017).

De igual forma, de los Santos y cols., (2018) evaluaron el impacto de (-)-epicatequina en el desarrollo de miocardiopatía dilatada en un ratón nulo para delta-sarcoglicano, los resultados sugirieron que la Epi tiene el potencial de prevenir el desarrollo de miocardiopatía dilatada de origen genético.

#### **4. Efectos de la epicatequina sobre la expresión del sistema apelinérgico**

de los Santos y cols., (2023) analizaron el efecto de Epi en la expresión de *Apln/Aplnr* en el tejido adiposo visceral de ratas de 245 días posnatales, descendientes de madres control y de un modelo materno de obesidad. Los investigadores encontraron que este flavonoide a una dosis de 1 mg/kg dos veces al día fue capaz de incrementar en forma significativa la expresión tanto de *Apln* como de *Aplnr*. Además, se evaluaron los niveles de proteínas implicadas en el metabolismo lipídico, destacando el incremento en la fosforilación de AMPK $\alpha$ , de Ser79 de la ACC (Acetil CoA carboxilasa), y una disminución de la sintasa de ácidos grasos (FAS), que en conjunto se traducen en incremento de la oxidación de ácidos grasos y disminución de la lipólisis.

En forma interesante una estudiante de posgrado de nuestro grupo (Munguía Salazar, 2021), investigó la influencia de la obesidad materna (MO) y la de la dieta (control o dieta alta en grasas) sobre la expresión del sistema *Apln/Aplnr* en tejido adiposo y cardiaco en crías de ratas macho Wistar de 110 días (equivalente a rata joven). En este estudio se observó que, en el tejido adiposo visceral, la expresión de *Apln* se encuentra predominantemente disminuido en el grupo MO

(destacando el efecto negativo de la programación fetal en el contexto de obesidad materna), en comparación con los grupos descendientes de madres control. Sin embargo, en el grupo descendiente de madres con obesidad alimentado con dieta alta en grasas, se observó un incremento significativo del RNAm de *ApIn* en comparación con el grupo homólogo con dieta control, mostrando la influencia que tiene la dieta sobre la expresión del gen de esta adipocina. En relación con los resultados de la expresión de RNAm del receptor *ApIn*, éste se observó significativamente disminuido en el grupo MO y mayormente disminuido en el grupo homólogo que además fue alimentado con dieta alta en grasas (grupo con doble estímulo) en comparación con los grupos descendientes de madre control o con dieta control o alta en grasas, sugiriendo que la obesidad materna de forma conjunta al tipo de dieta puede disminuir la expresión del receptor.

En este mismo estudio, al analizar la expresión del sistema apelinérgico en el tejido cardiaco, se encontró que la expresión de ambos genes (*ApIn/ApInr*) se ve aumentada en el grupo MO con dieta alta en grasas, así como en el grupo descendiente de madres control con dieta alta en grasas observándose que en tejido cardiaco, la obesidad materna aislada no se asoció a alteraciones significativas en la regulación del sistema apelinérgico en la progenie en comparación con descendientes de una madre control; sin embargo, es de destacarse que cuando las crías del grupo MO se ven expuestas a una dieta alta en grasas, se observa un aumento significativo en la expresión génica tanto de apelina como de su receptor (*ApIn/ApInr*) (Munguía Salazar, 2021).

Cabe destacar que en este estudio no se realizó la intervención con el flavonoide (-)-epicatequina en ninguno de los grupos experimentales, y con base en todos los estudios anteriormente

referidos (Yamazaki y cols., 2008; Meydani & Hasan, 2010; Ramírez-Sánchez y cols., 2010; Nogueira y cols., 2011; Castan-Laurell y cols., 2012; Attané y cols., 2012; Vázquez-Prieto y cols., 2012; de los Santos y cols., 2017; de los Santos y cols., 2018; Vinel y cols., 2018; de los Santos y cols., 2020; Portilla-Martínez y cols., 2022; de los Santos y cols., 2022; de los Santos y cols., 2023), en donde se describe que el flavonoide (-)-epicatequina puede revertir los efectos negativos causados por la obesidad, tanto por programación como por el estímulo de una dieta alta en grasas en la etapa posnatal, y la influencia que tiene sobre la expresión del sistema apelinérgico, es importante llevar a cabo este proyecto de investigación.

## **5. JUSTIFICACIÓN**

El incremento en la prevalencia de obesidad en mujeres en edad reproductiva representa un problema de salud, ya que puede conducir al desarrollo de obesidad y trastornos metabólicos en su descendencia (obesidad por programación), fenómeno que se intensifica si la descendencia recibe además una dieta alta en grasas en la etapa posnatal. El sistema apelinérgico (APLN/APLNR) es uno de los mecanismos intracelulares involucrados en esta programación. Nuestro grupo de investigación analizó el tejido adiposo visceral de ratas de 245 días descendientes de madres con obesidad, y observó disfunción en la expresión del sistema apelinérgico; la administración de (-)-epicatequina modificó la expresión de este sistema. Asimismo, otro estudio llevado a cabo por una alumna de posgrado de nuestra Unidad de Investigación (Munguía Salazar, 2021), encontró que en un grupo de ratas macho F1 de la cepa Wistar de 110 días posnatales (ratas jóvenes) descendientes de un modelo materno de obesidad y en un grupo de ratas obesas por programación alimentadas con una dieta alta en grasas, la

expresión de *Apln/Aplnr* tanto en tejido adiposo visceral como cardíaco se encontraba alterada; sin embargo, no se analizó si la Epi es capaz de modificar esta expresión. Con base en lo anterior, consideramos de relevancia analizar si la administración de (-)-epicatequina modifica la expresión del sistema apelinérgico en el tejido adiposo visceral y en el tejido cardíaco, con el fin de determinar si este flavonoide puede ser un auxiliar en el tratamiento de la obesidad y el impacto que esta tiene en el corazón.

## **6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿La administración del flavonoide (-)-epicatequina, inducirá cambios en la expresión de *Apln/Aplnr* en el tejido cardíaco y/o en el tejido adiposo visceral de ratas F1 de la cepa Wistar alimentadas con dieta alta en grasas descendientes de madres obesas?

## **7. OBJETIVO GENERAL**

El objetivo de este estudio es analizar la expresión de *Apln / Aplnr* en el tejido cardíaco y tejido adiposo visceral de ratas F1 de la cepa Wistar descendientes de madres obesas alimentadas con dieta alta en grasas tratadas con el flavonoide (-)-epicatequina.

## **8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Comparar la expresión mediante RT-qPCR del RNAm de *Apln* y de su receptor *Aplnr* en el tejido cardíaco de ratas F1 de la cepa Wistar entre los grupos:
  - a) Alimentadas con dieta control y tratadas con el flavonoide Epi, descendientes de madres control.

b) Alimentadas con dieta alta en grasas y tratadas con el flavonoide Epi, descendientes de madres control.

c) Alimentadas con dieta control y tratadas con el flavonoide Epi, descendientes de madres obesas.

d) Alimentadas con dieta alta en grasas y tratadas con el flavonoide Epi, descendientes de un madres obesas.

5. Comparar mediante RT-qPCR la expresión del RNAm de *Apln* y *Aplnr* en el tejido adiposo visceral de ratas F1 de la cepa Wistar entre los grupos:

a) Alimentadas con dieta control y tratadas con el flavonoide Epi, descendientes de madres control.

b) Alimentadas con dieta alta en grasas y tratadas con el flavonoide Epi, descendientes de madres control.

c) Alimentadas con dieta control y tratadas con el flavonoide Epi, descendientes de madres obesas.

d) Alimentadas con dieta alta en grasas y tratadas con el flavonoide Epi, descendientes de madres obesas.

## 9. HIPÓTESIS

1. El flavonoide (-)-epicatequina aumentará la expresión de *Apln* y *Aplnr* en el tejido cardíaco y en el tejido adiposo visceral de ratas F1 de la cepa Wistar descendientes de **madres obesas** alimentadas con dieta control.

2. El flavonoide (-)-epicatequina aumentará la expresión de *Apln* y *Aplnr* en el tejido cardíaco y en el tejido adiposo visceral de ratas F1 de la cepa Wistar descendientes de madres obesas alimentadas con dieta alta en grasas.

## 10. MATERIAL Y MÉTODOS

Se trata de un estudio transversal, descriptivo y analítico. Se analizó el tejido cardíaco y el tejido adiposo visceral de una cepa de ratas Wistar provenientes de un proyecto previo llevado a cabo por nuestro grupo de trabajo titulado “Caracterización de la expresión del sistema apelinérgico de crías f1 de la cepa Wistar alimentadas con dieta control o alta en grasas descendientes de un modelo animal de obesidad”, con registro y aprobación por parte del Comité de Investigación y Comité de Ética de la Investigación de la Facultad de Medicina UNAM, con registro FM/DI/075/SST/2023.

Este proyecto también fue también aprobado por la Comisión de Investigación en Animales del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, con clave UIO-1892-17/19-

1. De igual forma, las ratas se trataron de acuerdo con la normativa vigente en cuanto a protección de los animales utilizados en experimentación de acuerdo con el Canadian Council on Animal Care, disponible en la página:

([http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Appropriate\\_endpoint.pdf](http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Appropriate_endpoint.pdf)).

### 10.1 Modelo animal

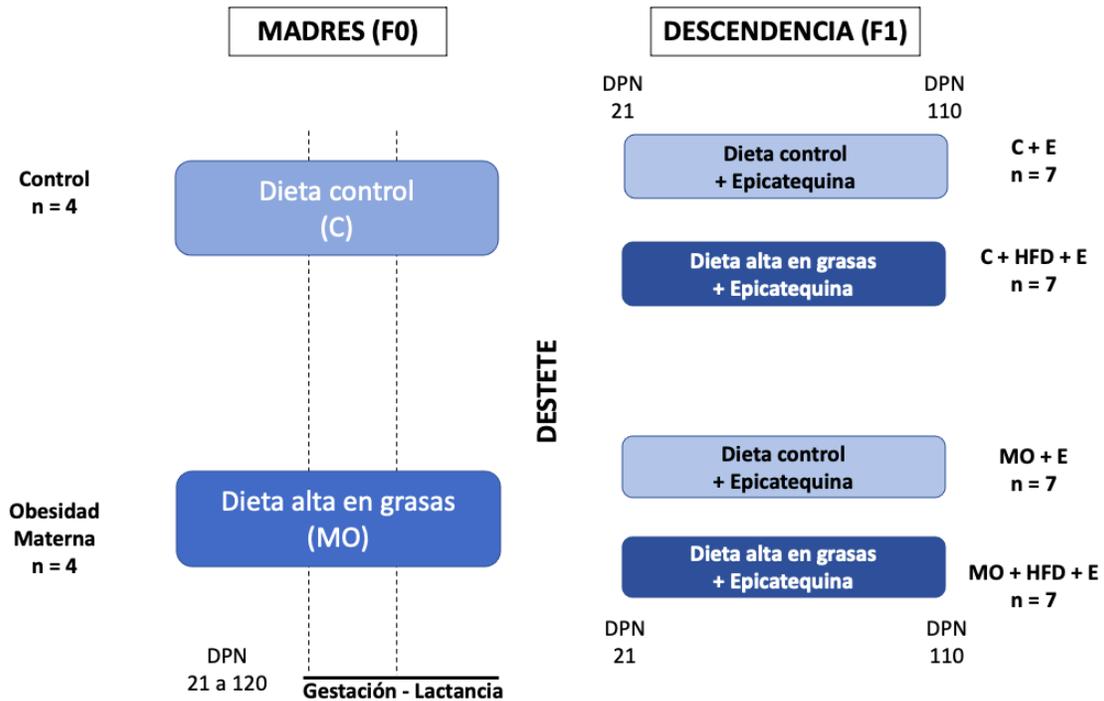
Previo al desarrollo del presente estudio, nuestro grupo de investigación indujo el desarrollo de obesidad mediante una dieta alta en grasas a 4 ratas hembra de la estirpe Wistar recién

destetadas (F0). Tras 120 días posnatales (DPN), estas hembras fueron apareadas con machos de la misma estirpe para obtener las crías macho experimentales (F1) para la realización de este proyecto (n=28): 14 de estas crías descendientes de madres con dieta control o dieta chow (control), y 14 descendientes de madres con obesidad inducida por dieta alta en grasas.

La composición de la dieta alta en grasas fue la siguiente: 23.5% proteína, 20.0% manteca de cerdo, 5.0% aceite de maíz, 20.2% polisacáridos, 20.2% azúcares simples, 5.0% fibra, 5.0% mezcla de minerales y 1.0% mezcla de vitaminas, siendo el valor energético de 4.9 kcal/g; proporcionado al destete (21 DPN), durante el crecimiento y hasta el apareamiento (120 DPN), gestación y lactancia. El grupo control fue alimentado durante el mismo periodo con una dieta comercial para roedores (Zeigler Rodent RQ22-5) que contiene 22.0% proteína, 5.0% grasa vegetal, 31.0% polisacáridos, 31.0% azúcares simples, 4.0% fibra, 6.0% minerales y 1.0% vitaminas, siendo el valor energético de 4.0 kcal/g. El agua y alimento fueron proporcionados *ad libitum*.

Al dividirse nuevamente cada grupo de ratas con base en el tipo de dieta a recibir (dieta control o dieta alta en grasas + Epicatequina), se obtuvieron 4 grupos finales (con 7 crías por cada grupo): descendientes de madre control + epicatequina (C + E), descendientes de madre control + dieta alta en grasas + epicatequina (HFD + E), descendientes de madre con obesidad + epicatequina (MO + E) y finalmente descendientes de madre con obesidad + dieta alta en grasas + epicatequina (MO + HFD + E). Cada uno de estos grupos recibió intervención con Epi administrada por vía oral, a una dosis de 1 mg/kg dos veces al día durante un periodo de dos semanas (Fig. 1). En el día postnatal 110, después de 6 horas de ayuno, las ratas fueron anestesiadas con isoflurano (según las instrucciones de uso del inhalador de isoflurano de la marca: Stoelting Co, Cat. No. 50207 con

respecto al peso del animal) y fueron sacrificadas; se obtuvieron los tejidos de interés, los cuales fueron pesados individualmente y almacenados a -80°C para su posterior análisis.



**Figura 3.** Cronología del estudio. Se criaron madres (F0) alimentadas con dieta control (C) y madres alimentadas con dieta hipercalórica alta en grasas (MO) las cuales desarrollaron obesidad. Se intervino a su descendencia (F1) con Epi. Estos grupos a su vez se dividieron en descendientes que recibieron una dieta control (C) y una dieta hipercalórica alta en grasas (HFD). **DPN:** Día posnatal. **C+E:** ratas alimentadas con dieta control tratadas con Epi descendientes de madres alimentadas con dieta control; **HFD+E:** ratas alimentadas con dieta alta en grasas tratadas con Epi descendientes de madres alimentadas con dieta control; **MO+E:** ratas alimentadas con dieta control tratadas con Epi descendientes de madres alimentadas con dieta rica en grasas; **MO+HFD+E:** ratas alimentadas con dieta alta en grasas tratadas con Epi descendientes de madres obesas.

## 10.2 Extracción de RNA

Para la extracción de RNA se empleó el tejido adiposo visceral (retroperitoneal) y el tejido cardíaco de ratas macho de 110 días posnatales de la estirpe Wistar; ambos tejidos se encontraban almacenados a -80°C (con un criopreservador de tejidos en fresco).

Se utilizaron 40 mg de tejido adiposo retroperitoneal para obtener el RNA total, utilizando el estuche de purificación de RNA para tejido adiposo (Norgen, Biotek Corp., Ontario, Canadá), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. La pureza y las concentraciones del RNA se determinaron con un nanofotómetro (Implen GmbH, München, Alemania). Se utilizaron 100 µg de RNA para la síntesis de DNA (DNAc) utilizando el AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit Reagents (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Para obtener el RNA total de tejido cardíaco se utilizaron 50 mg, utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen, California, E.E.U.U.) según el protocolo del fabricante. Posteriormente, se evaluó la integridad del RNA por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.2 %; asimismo, dichas muestras se cuantificaron por espectrofotometría y se determinó la pureza de estos a través de la relación A260/280.

## 10.3 Análisis de expresión génica

La expresión génica de *Apln* y su receptor *Aplnr*, se analizó mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR), utilizando las sondas de expresión génica TaqMan on Demand de Applied Biosystem. Para *Apln* (ID del ensayo:

Rn00581093m1) y para *Aplnr* (ID del ensayo: Rn00580252s1). Los valores se normalizaron a cantidades relativas de  $\beta$ -actina (ID de ensayo: Hs01120795m1) para cada muestra.

La PCR cuantitativa con transcripción inversa se realizó en un equipo LightCycler® 480 (Roche Diagnostics Ltd, Suiza) y las concentraciones relativas de RNAm se calcularon con un software de análisis de cuantificación relativa LightCycler®. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado. La cuantificación relativa se determinó mediante el procedimiento  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

## **11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se calcularon medidas de tendencia central y de dispersión para los valores de expresión génica relativa. Las diferencias de expresión génica relativa entre los grupos se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis con prueba pos hoc de Dunn.

Se realizó el análisis mediante el software estadístico Prism GraphPad en su versión 9.3.1.

### **11.1 Tamaño de la muestra**

El actual proyecto se dividió en dos etapas; en la primera etapa se generó a las hembras obesas F0, mientras que la segunda se destinó a la evaluación de las crías F1. Para la primera etapa de este proyecto, se utilizaron 37 hembras de la estirpe Wistar, las cuales se distribuyeron de la siguiente forma: 12 ratas se destinaron al grupo control y 25 ratas al grupo de obesidad materna. Las camadas se ajustaron a 7 crías por madre al nacimiento. Se utilizó este número de muestra tomando en cuenta a las posibles ratas que serían excluidas del proyecto por diversas razones como un número de camada mayor de 12 o menor de 7, o que no queden preñadas. De acuerdo con nuestra experiencia en proyectos anteriores, la tasa de fertilidad de las ratas control en el

Bioterio del INCMNSZ es del 70% y de las ratas obesas del 40% por lo que se esperaba que al menos 9 y 10 ratas queden preñadas por grupo y que al menos 8 y 8 respectivamente tuvieran un número de crías de 6 a 10 y pudieran ser incluidas en el estudio, por lo que se estimó que al finalizar el experimento quedaría una “n=7” por cada camada. Las ratas excluidas estuvieron disponibles para el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio como animales fuera del protocolo.

Para este estudio, la “n” se calculó matemáticamente de acuerdo con el algoritmo de la prueba de porcentaje de éxito y error (por grupo/por prueba) (Ilar y cols., 2002), el cual se presenta a continuación:

$$n = \log 1 - \beta / \log p$$

Donde:

$\beta$  = Poder de la prueba estadística (90%)

p = Proporción de animales que presentan el evento (70% éxito en lograr gestación)

Sustituyendo:

$$n = \log (1 - 0.90) / \log (0.70)$$

$$n = 6.6 \text{ por grupo/por prueba}$$

$$n = 7 \text{ ratas por grupo}$$

Se extrajo el RNA total del tejido adiposo y del tejido cardíaco de las ratas de 110 días posnatal que integraron cada grupo de estudio:

1. Ratas alimentadas con dieta control tratadas con Epi descendientes de madres alimentadas con dieta control (C + E; n=7).
2. Ratas alimentadas con dieta alta en grasas tratadas con Epi descendientes de madres alimentadas con dieta control (HFD + E; n=7).
3. Ratas alimentadas con dieta control tratadas con Epi descendientes de madres alimentadas con dieta rica en grasas (MO + E; n=7).
4. Ratas alimentadas con dieta alta en grasas tratadas con Epi descendientes de madres alimentadas con dieta rica en grasas (MO + HFD + E; n=7).

## 12. RESULTADOS

Se procedió a evaluar la pureza del RNA de cada una de las muestras correspondientes a los grupos experimentales encontrando que todas ellas presentaron una pureza óptima para el estudio (los valores se deben situar en el rango de 1.8 a 2.0 de la relación 260/280) . De forma simultánea, se cuantificaron las concentraciones de RNA total de cada una de las muestras extraídas. A continuación, en las Tablas 1 y 2 se resume lo anterior; tales resultados se presentan como una muestra representativa de cada uno de los grupos de estudio (n=7).

**Tabla 3. Cuantificación y pureza del RNA total obtenido del tejido cardiaco de ratas Wistar descendientes de cada grupo experimental**

		C + E					
# Muestra	5	7	16	19	21	27	36
ng/uL	2700	1508	2990	2432	1868	2118	2056
260/280	2.00	1.98	2.01	2.03	2.04	1.99	2.01
		HFD + E					
# Muestra	2	11	20	24	32	37	40
ng/uL	2858	2234	2268	2574	1680	2306	2386
260/280	1.94	2.00	1.97	1.989	2.01	2.01	1.953
		MO + E					
# Muestra	10	14	19	25	31	36	39
ng/uL	2764	2128	2116	1436	2268	2170	2178
260/280	1.98	1.99	2.01	1.99	1.99	1.99	1.94
		MO + HFD + E					
# Muestra	3	8	13	20	22	26	34
ng/uL	2696	2062	2192	2044	1812	2426	2706
260/280	2.04	1.98	2.03	1.98	1.97	1.99	1.99

C+E = ratas alimentadas con dieta control tratadas con Epi descendientes de madres alimentadas con dieta control; HFD+E = ratas alimentadas con dieta alta en grasas tratadas con Epi descendientes de madres alimentadas con dieta control; MO+E = ratas alimentadas con dieta control tratadas con Epi descendientes de madres alimentadas con dieta rica en grasas; MO+HFD+E = ratas alimentadas con dieta alta en grasas tratadas con Epi descendientes de madres alimentadas con dieta rica en grasas.

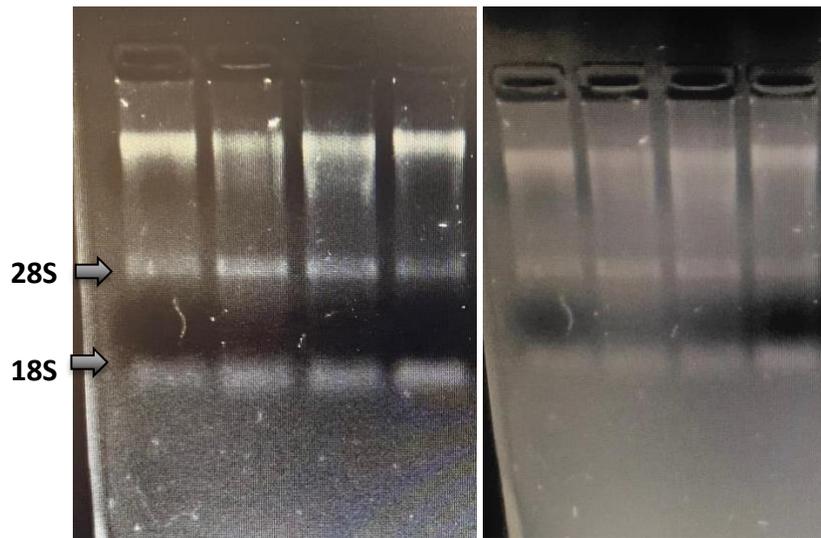
**Tabla 4. Cuantificación y pureza del RNA total obtenido del tejido adiposo de ratas Wistar descendientes de cada grupo experimental**

		<b>C + E</b>					
<b># Muestra</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>16</b>	<b>19</b>	<b>21</b>	<b>27</b>	<b>36</b>
<b>ng/uL</b>	60	66	52	55	78	62	38
<b>260/280</b>	<i>1.89</i>	<i>1.91</i>	<i>1.93</i>	<i>1.97</i>	<i>1.98</i>	<i>1.98</i>	<i>1.94</i>
		<b>HFD + E</b>					
<b># Muestra</b>	<b>2</b>	<b>11</b>	<b>20</b>	<b>24</b>	<b>32</b>	<b>37</b>	<b>40</b>
<b>ng/uL</b>	55	52	67	67	47	51	59
<b>260/280</b>	<i>1.92</i>	<i>1.99</i>	<i>1.97</i>	<i>1.98</i>	<i>1.97</i>	<i>1.99</i>	<i>1.93</i>
		<b>MO + E</b>					
<b># Muestra</b>	<b>10</b>	<b>14</b>	<b>19</b>	<b>25</b>	<b>31</b>	<b>36</b>	<b>39</b>
<b>ng/uL</b>	38	44	29	31	46	66	62
<b>260/280</b>	<i>1.92</i>	<i>1.95</i>	<i>2.00</i>	<i>1.99</i>	<i>1.98</i>	<i>1.92</i>	<i>1.91</i>
		<b>MO + HFD + E</b>					
<b># Muestra</b>	<b>3</b>	<b>8</b>	<b>13</b>	<b>20</b>	<b>22</b>	<b>26</b>	<b>34</b>
<b>ng/uL</b>	48	61	58	60	34	45	50
<b>260/280</b>	<i>1.94</i>	<i>1.92</i>	<i>1.91</i>	<i>1.93</i>	<i>1.94</i>	<i>1.95</i>	<i>1.99</i>
<p><b>C+E</b> = ratas alimentadas con dieta control tratadas con Epi descendientes de madres alimentadas con dieta control; <b>HFD+E</b> = ratas alimentadas con dieta alta en grasas tratadas con Epi descendientes de madres alimentadas con dieta control; <b>MO+E</b> = ratas alimentadas con dieta control tratadas con Epi descendientes de madres alimentadas con dieta rica en grasas; <b>MO+HFD+E</b> = ratas alimentadas con dieta alta en grasas tratadas con Epi descendientes de madres alimentadas con dieta rica en grasas.</p>							

En cuanto a la calidad e integridad de las muestras de RNA obtenidas, se evaluaron con electroforesis en geles de agarosa al 1.2%, identificándose un adecuado patrón de integridad y adecuada identificación de las bandas ribosomales 28S y 18S (Figuras 2 y 3).



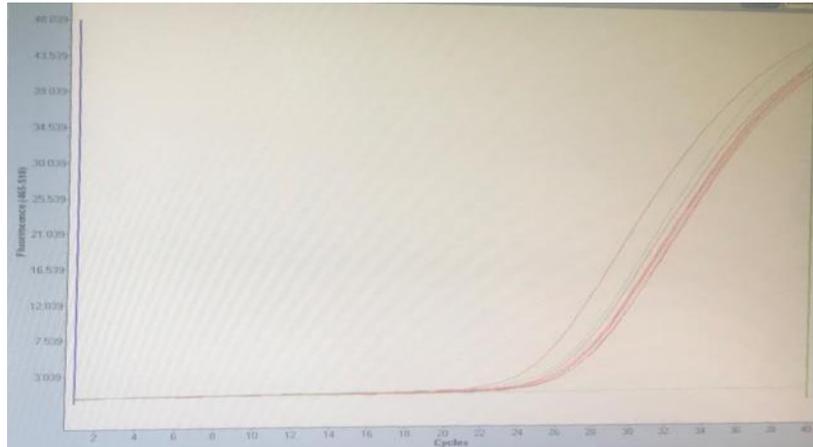
**Figura 4.** Electroforesis de RNA de tejido cardiaco. Se presenta la electroforesis del RNA extraído de dos muestras seleccionadas al azar por cada grupo de estudio.



**Figura 5.** Electroforesis de RNA de tejido adiposo. Se presenta la electroforesis del RNA extraído de dos muestras seleccionadas al azar por cada grupo de estudio.

Por otra parte, se hizo también una PCR en tiempo real, con una muestra control aleatoria para *Apln* y su receptor *Aplnr* y un gen constitutivo o endógeno ( $\beta$ -actina), esto para verificar que la muestra obtenida mediante la extracción de RNA con Trizol (para el tejido cardíaco), o con el Kit *Norgen Biotec Corporation: Fatty Tissue RNA purification Kit*<sup>®</sup> (para el tejido adiposo visceral),

amplificaba con las sondas correspondientes y de ese modo comprobar de nueva cuenta que la extracción se realizó de manera correcta (Figura 4).



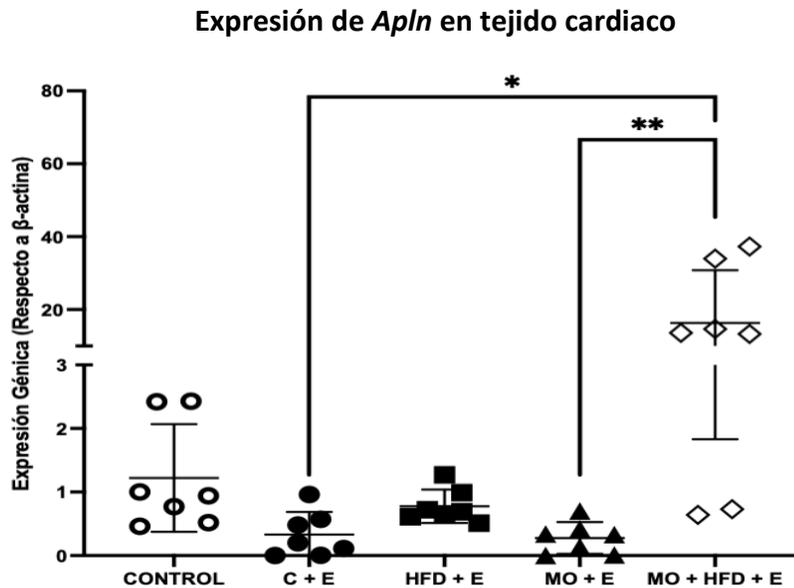
**Figura 6.** RT-qPCR. Expresión de *Apln* y *Aplnr* de dos muestras tomadas al azar. Grupos C + Epi y HFD + Epi en tejido cardíaco con un control negativo. C+E= ratas alimentadas con dieta control tratadas con Epi descendientes de madres alimentadas con dieta control; HFD+E= ratas alimentadas con dieta alta en grasas tratadas con Epi descendientes de madres alimentadas con dieta control.

Se utilizó el método delta-delta Ct para comparar la variación en la expresión de *Apln* y *Aplnr* contra el gen endógeno de referencia  *$\beta$ -actina*. Los resultados fueron graficados y analizados con el software GraphPad Prism en su versión 9.0.

Para fines de comparación, se agregó un grupo control tomado de un estudio previo que incluyó ratas de las mismas características del presente estudio, descendientes de madres sin obesidad (madres control), que recibieron dieta control y que no fueron intervenidas con Epi.

Una vez estandarizada todas las técnicas se procedió al análisis de la expresión génica de *Apln* y *Aplnr* en el tejido cardíaco y en el tejido adiposo visceral.

Con respecto al tejido cardíaco, se observó un aumento de la expresión significativa de *Apln* en el grupo con los tres estímulos (MO + HFD + E), en comparación con los grupos C + E y MO + E ( $p=0.003$  y  $p=0.001$  respectivamente) (Gráfica 1A).

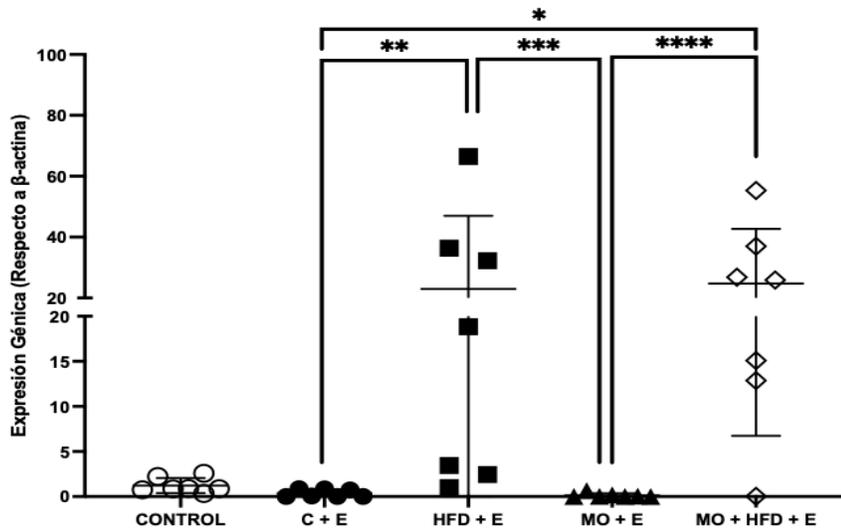


**Gráfica 1A.** Efecto de la dieta, la obesidad materna y epicatequina sobre la expresión relativa del RNAm de *Apln* en tejido cardíaco de los descendientes. Se observó diferencia significativa entre el grupo MO + HFD + E vs. los grupos C + E y MO + E ( $*p=0.003$  y  $**p=0.001$ , respectivamente). Resultados expresados como media  $\pm$  Desviación. Los datos fueron analizados con la prueba de Kruskal-Wallis seguido de la prueba post hoc de Dunn para la comparación de pares;  $n=7$  ratas macho por grupo. **C + E:** Descendientes de madres control + Epicatequina. **HFD + E:** Descendientes de madres control con dieta alta en grasas + Epicatequina. **MO + E:** Descendientes de madres obesas + Epicatequina. **MO + HFD + E:** Descendientes de madres obesas + Dieta alta en grasas + Epicatequina

Respecto al receptor *Aplnr* en tejido cardíaco, se observó una mayor expresión de este gen en los grupos de ratas alimentadas con dieta alta en grasas + Epi (HFD + E) y el grupo con tres estímulos (MO + HFD + E). Al comparar con los otros grupos, se observó diferencia significancia entre el grupo HFD + E y los grupos C + E y MO + E ( $p=0.01$  y  $p=0.001$  respectivamente), así como entre el grupo MO + HFD + E y los grupos MO + E y C + E ( $p=0.003$  y  $p=0.02$  respectivamente). No se

observaron diferencias al comparar los grupos que recibieron la intervención con Epi con el grupo control que no recibió ningún estímulo (Gráfica 1B).

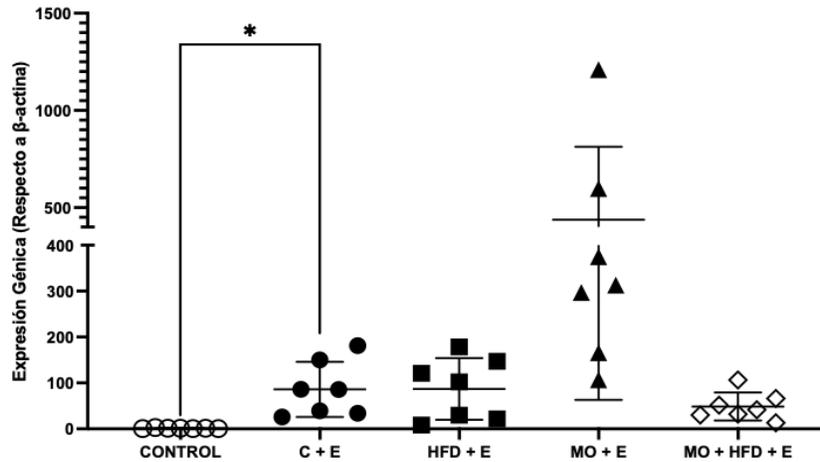
### Expresión de *Aplnr* en tejido cardiaco



**Gráfica 1B.** Efecto de la dieta, la obesidad materna y epicatequina sobre la expresión relativa del RNAm de *Aplnr* en tejido cardiaco de los descendientes. Se observó diferencia significativa entre el grupo MO + HFD + E vs. los grupos C + E y MO + E (\* $p=0.003$  y \*\*\*\* $p=0.02$  respectivamente). Se observó también diferencia significativa entre el grupo HFD + E vs. Los grupos C + E y MO + E (\*\* $p=0.01$  y \*\*\* $p=0.001$  respectivamente). Resultados expresados como media  $\pm$  Desviación. Los datos fueron analizados con la prueba de Kruskal-Wallis seguido de la prueba post hoc de Dunn para la comparación de pares;  $n=7$  ratas macho por grupo. **C + E:** Descendientes de madres control + Epicatequina. **HFD + E:** Descendientes de madres control con dieta alta en grasas + Epicatequina. **MO + E:** Descendientes de madres obesas + Epicatequina. **MO + HFD + E:** Descendientes de madres obesas + Dieta alta en grasas + Epicatequina.

Con respecto a la expresión del sistema apelinérgico en el tejido adiposo visceral, encontramos que la intervención con Epi aumentó la expresión en forma significativa de *Aplnr* (grupo C + Epi) en comparación del grupo control ( $p=0.03$ ) (Gráfica 2A). A pesar de que la intervención con este flavonoide en el grupo MO presentó un aumento en la expresión de *Aplnr* (grupo MO + Epi) con respecto al grupo control, esta diferencia no fue significativa (Gráfica 2A).

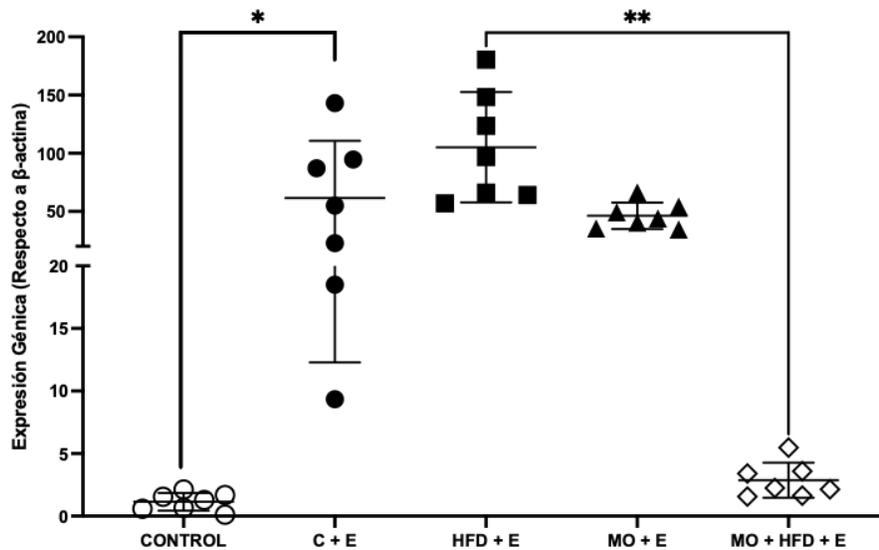
## Expresión de *Ap1n* en tejido adiposo



**Gráfica 2A.** Efecto de la dieta, la obesidad materna y epicatequina sobre la expresión relativa del RNAm de *Ap1n* en tejido adiposo de los descendientes. Se observó diferencia significativa entre el grupo C + E y el grupo control (\* $p=0.03$ ). Resultados expresados como media  $\pm$  Desviación. Los datos fueron analizados con la prueba de Kruskal-Wallis seguido de la prueba post hoc de Dunn para la comparación de pares;  $n=7$  ratas macho por grupo. **C + E:** Descendientes de madres control + Epicatequina. **HFD + E:** Descendientes de madres control con dieta alta en grasas + Epicatequina. **MO + E:** Descendientes de madres obesas + Epicatequina. **MO + HFD + E:** Descendientes de madres obesas + Dieta alta en grasas + Epicatequina

Al analizar la expresión del gen *Ap1nr* en tejido adiposo, se observó una expresión aumentada en forma significativa al comparar el grupo C + E *versus* el grupo control ( $p=0.005$ ). Por otra parte, la administración de Epi disminuyó la expresión de este receptor en el grupo MO + HFD + E vs. HFD + E ( $p=0.003$ ) (Gráfica 2B).

### Expresión de *Aplnr* en tejido adiposo



**Gráfica 2B.** Efecto de la dieta, la obesidad materna y epicatequina sobre la expresión relativa del RNAm de *Aplnr* en tejido adiposo de los descendientes. Se observó diferencia significativa entre el grupo MO + HFD + E y el grupo HFD + E (\*\* $p=0.003$ ), y diferencia significativa entre el grupo C + E y el grupo control (\* $p=0.005$ ). Resultados expresados como media  $\pm$  Desviación. Los datos fueron analizados con la prueba de Kruskal-Wallis seguido de la prueba post hoc de Dunn para la comparación de pares;  $n=7$  ratas macho por grupo. **C + E:** Descendientes de madres control + Epicatequina. **HFD + E:** Descendientes de madres control con dieta alta en grasas + Epicatequina. **MO + E:** Descendientes de madres obesas maternas + Epicatequina. **MO + HFD + E:** Descendientes del modelo de madres obesas + Dieta alta en grasas + Epicatequina

### 13. DISCUSIÓN

Se ha descrito que el corazón de los descendientes de madres con obesidad, tienen mayor riesgo de desarrollar hipertrofia de tipo patológico, mayor estrés oxidativo, fibrosis, alteraciones de la contractilidad, arteriopatía coronaria y por lo tanto mayor riesgo de desarrollar insuficiencia cardiaca en la etapa adulta (De Jong y cols., 2018; Loche y cols., 2018; Blackmore y cols., 2014; Kankowski y cols., 2022; Matuszak y cols., 2024). La activación del sistema apelinérgico (APLN/APLNR), ha demostrado tener efectos benéficos al hacer reversibles cambios asociados a la cardiopatía asociada a la obesidad (Ceylan-Isik y cols., 2013; Lu y cols., 2016; Li y cols., 2021). Por su parte, el flavonoide (-)-epicatequina ha demostrado también sus efectos benéficos al prevenir el desarrollo de miocardiopatía dilatada de origen genético, favorecer las vías relacionadas con la hipertrofia de tipo fisiológico y tener efectos protectores anti-isquémicos y que se oponen a la remodelación patológica (Yamazaki y cols., 2008; de los Santos y cols., 2017; de los Santos y cols., 2018). Se ha sugerido que la Epi puede comportarse como un ligando de APLNR, y aunque no ejerce todos sus efectos directamente a través de la interacción con este receptor, posee mecanismos de acción compartidos con el sistema APLN/APLNR (Portilla-Martínez y cols., 2022). La Epi puede además incrementar la expresión de APLN/APLNR (de los Santos y cols., 2022 ). Por lo anteriormente descrito, una mayor expresión y activación del sistema apelinérgico, así como los efectos mediados por el flavonoide Epi, podrían contrarrestar los mecanismos patológicos involucrados en las alteraciones cardíacas.

Con respecto a nuestros resultados en el tejido cardíaco, observamos una mayor expresión tanto del ligando *ApIn* como de su receptor *ApInr* en el grupo con doble estímulo tratado con el flavonoide epicatequina (MO + HFD + E) con respecto a los grupos C + E y MO + E ( $p= 0.003$  y

p=0.001 respectivamente). Como se describió previamente, la dieta es uno de los factores endógenos más importantes que pueden modificar la expresión de *Apln/Aplnr*, y particularmente la dieta alta en grasas se comporta como un estímulo que favorece su incremento (García-Díaz y cols., 2007). Por el contrario, la presencia de obesidad (mediada por programación o por dietas hipercalóricas y altas en grasas), se comporta como un factor con efecto negativo sobre la expresión del sistema apelinérgico (Mehri y cols., 2023). Sin embargo, cuando ambos estímulos están presentes, el efecto de la dieta alta en grasas se sobrepone al efecto de la obesidad (Munguía-Salazar, 2021). Como se observa en nuestros resultados, cuando se agrega el efecto de la intervención con Epi, este incremento continúa siendo destacable en los grupos que tuvieron dieta alta en grasas (HFD + E y MO + HFD + E). Sin embargo, los grupos C + E, HFD + E y MO + E, no muestran incremento significativo en la expresión de *Apln* e incluso mantienen una menor expresión respecto al grupo control que no recibió ningún estímulo. Esto podría al menos en parte ser explicado por el efecto positivo que la Epi tiene sobre la biogénesis mitocondrial, y el incremento en la oxidación de ácidos grasos en las células miocárdicas (Panneerselvam y cols., 2010). El tejido miocárdico depende principalmente de la oxidación de ácidos grasos como fuente de energía, y esta vía metabólica es favorecida tanto por la Epi como por la activación del sistema apelinérgico a través de incremento de la fosforilación de AMPK y una mayor activación de la vía de PGC1 $\alpha$  (Ceylan y cols., 2013; Pang y cols., 2023; Castan-Laurell y cols., 2012; Attané y cols., 2012), por lo cual, al existir ambos estímulos, la disminución en la expresión de APLN podría ser resultado de una regulación negativa que evite saturación o sobreestimulación de estas vías, sin que esto se oponga a los efectos benéficos ya descritos de la Epi en el corazón (Yamazaki y cols., 2008; de los Santos y cols., 2017).

En tejido cardiaco, los grupos C + E y MO + E, mostraron disminución del receptor *Aplnr* en concordancia con la disminución homóloga del RNAm del ligando *Apln*. Sin embargo, destaca que ocurrió lo contrario para el grupo HFD + E, en el que a pesar de una expresión disminuida de *Apln*, se observó incremento significativo en el receptor *Aplnr*. Aunque el mecanismo de este hallazgo no es bien conocido, cabe resaltar que APLN no es el único ligando identificado del receptor APLNR. Se ha descrito otra molécula estructuralmente similar a la APLN conocida como ELABELA, que puede activar la vía ELABELA/APLNR y favorecer también mecanismos como vasodilatación, incremento en la oxidación de eNOS, disminución de especies reactivas de oxígeno, inotropismo positivo y antagonismo sobre los efectos de hipertrofia cardiaca patológica y vasoconstricción mediados por Angiotensina II (Pang y cols., 2023). El análisis de la expresión de ELABELA no fue objetivo de este estudio, sin embargo, un probable incremento en su expresión concordante con el incremento en la expresión del gen del receptor *Aplnr*, podría compensar la disminución en la expresión de *Apln* manteniendo así los efectos cardioprotectores del sistema apelinérgico mediado por el complejo ELABELA/APLNR. Así mismo, considerando que la Epi tiene capacidad de ser un ligando para APLNR, esta podría estar ejerciendo también su efecto a través de su unión con este receptor. Por lo tanto, el incremento en la activación del sistema apelinérgico a nivel miocárdico a través de la vía APLN/APLNR, ELABELA/APLNR o Epi/APLNR, así como los propios efectos de la Epi no mediados por APLNR, conlleva a la activación de la vía PI3K/AKT que favorece la remodelación cardiaca de tipo fisiológico, así como las mencionadas vías de AMPK, PGC1 $\alpha$  y fosforilación de eNOS. La Epi puede además incrementar la expresión *Apln/Aplnr*, destacándose los efectos cardioprotectores de este flavonoide.

La Epi siendo agonista del receptor APLNR, es capaz también de activar la vía de la  $\beta$ -arrestina (además de la vía PI3K/AKT), favoreciendo la internalización y disminución en los niveles del receptor, ejerciendo también un efecto contraregulator que evite la sobreactivación del sistema apelinérgico (Portilla-Martínez y cols., 2022). Este efecto junto con la disminución en la expresión del ligando APLN, podrían entonces representar mecanismos de contrarregulación mediados por la propia actividad del flavonoide.

En cuanto al tejido adiposo, es de destacarse que los descendientes de madres con obesidad tienen también mayor riesgo de desarrollar obesidad, así como sus complicaciones en la etapa adulta (Reynolds y cols., 2010; Vasudevan y cols., 2011). La activación del sistema apelinérgico (APLN/APLNR) en este tejido, ha demostrado tener efectos benéficos al regular negativamente mecanismos como la adipogénesis y la lipogénesis, así como incrementar la oxidación de ácidos grasos, disminuyendo en consecuencia los triglicéridos circulantes, la resistencia a la insulina, y favoreciendo cambios en la composición corporal a través de la disminución del tamaño de los adipocitos y reducción en el almacenamiento intracelular de lípidos (De los Santos y cols., 2022).

La Epi comparte también mecanismos con el sistema apelinérgico en el tejido adiposo, ya que ambos estímulos favorecen la fosforilación de AMPK, la oxidación de ácidos grasos, y la fosforilación de enzimas como la AcetilCoA carboxilasa (ACC), disminuyendo la actividad de la lipasa adipocítica de triglicéridos (ATGL), y finalmente disminuyendo la lipólisis y la liberación de ácidos grasos libres a la circulación (De los Santos y cols., 2020; Portilla-Martínez y cols., 2022).

Por otro lado, la activación del sistema apelinérgico y la Epi disminuyen la adipogénesis de forma sinérgica (diferenciación de nuevos adipocitos) a través de la inhibición de factores de transcripción como C/EBP $\alpha$  y PPAR $\gamma$  (De los Santos y cols., 2020). Es entonces que una mayor

expresión y activación del sistema apelinérgico, así como los efectos mediados por el flavonoide Epi, pueden contrarrestar los mecanismos metabólicos patológicos involucrados en la obesidad por programación o por dietas altas en grasa en la descendencia.

Por otro lado, la obesidad ha demostrado ser una condición que disminuye la expresión del sistema apelinérgico (Wu y cols., 2014; Cano-Martínez y cols., 2022), y la intervención con Epi se opone a este efecto (de los Santos y cols., 2023).

En cuanto a los resultados observados en el tejido adiposo, se observó un importante incremento en la expresión del RNAm tanto de ligando como del receptor (*Apln/Aplnr*) en el grupo MO + E, aunque en ambos casos esta diferencia no alcanzó significancia estadística. Para los grupos HFD + E y MO + HFD + E, se observó incremento en la expresión de *Apln* respecto al grupo control sin ningún estímulo, aunque la diferencia no fue significativa, sin embargo, al comparar con este mismo grupo, el grupo C + E mostró mayor expresión con diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.03$ ). Lo anterior, refuerza el efecto positivo que tiene la intervención con Epi en todos los grupos al favorecer mayor expresión del RNAm de *Apln* en tejido adiposo similar al previamente descrito en otro estudio de nuestro grupo (de los Santos y cols., 2023).

Por otro lado, destaca que el grupo HFD + E mostró también aumento importante en la expresión de *Aplnr*, concordante con el aumento en su expresión de *Apln*, mostrando nuevamente el efecto de la dieta alta en grasas sobre la expresión del sistema apelinérgico, y observándose diferencia significativa al comparar con el grupo MO + HFD + E ( $p=0.003$ ). En este último grupo la expresión de *Aplnr* se observó marcadamente disminuida respecto al resto de los grupos intervenidos con Epi, sin alcanzar diferencia estadísticamente significativa.

Se ha descrito que la Epi es capaz de unirse al receptor APLNR y activar principalmente las vías PI3K/AKT y de la  $\beta$ -arrestina. Esta última es capaz de generar cambios conformacionales en APLNR y favorecer internalización del receptor, disminuyendo su activación. Sin embargo, eso no implicaría la pérdida de los efectos benéficos de la intervención con Epi por otros mecanismos independientes de APLNR, como lo han demostrado los cambios favorables observados en el metabolismo y composición corporal en modelos animales con doble estímulo (de los Santos y cols., 2022). Cabe destacar que este estudio analiza la expresión génica y no los niveles de la proteína APLNR, además que se desconoce si existe un mecanismo por el cual la vía de la  $\beta$ -arrestina pudiera regular negativamente la expresión de *Aplnr*. Por otro lado, la disminución en tejido adiposo de la expresión de *Aplnr* pudiera ser también consecuencia de los mecanismos de programación fetal, que, al estar presentes junto con una dieta alta en grasas, afecten de forma negativa la expresión del *Aplnr* y por lo tanto la activación del sistema apelinérgico a este nivel. Esta disminución fue observada de forma similar en ratas descendientes de madres con obesidad alimentadas con dieta alta en grasas sin la intervención con Epi (Munguía Salazar, 2011).

Finalmente, de forma similar a como ocurre con el RNAm en tejido adiposo del ligando *Apln*, el grupo C + E mostró mayor expresión del receptor *Aplnr* en comparación con el grupo control sin ningún estímulo con diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.005$ ), siendo el incremento de la expresión de *Apln* concordante con la expresión de *Aplnr*, observándose de nueva cuenta el efecto positivo de la intervención con Epi en la expresión de *Apln/Aplnr*. Es importante destacar que el efecto del sistema apelinérgico y de la Epi comparten mecanismos que activan vías similares de acción intracelular, además de que la Epi por sí misma aumenta la expresión del sistema apelinérgico (De los Santos y cols., 2022). Finalmente la Epi puede comportarse como un

agonista del receptor APLNR estimulando específicamente las vías PI3K/AKT y de la  $\beta$ -arrestina (Portilla-Martínez y cols., 2022).

Dentro de las limitaciones de este estudio, destaca que únicamente se analizó la expresión génica (RNAm) tanto de APLN como de APLNR y no a nivel de proteína. Además, no se pudieron comparar los resultados de todos los grupos intervenidos con el flavonoide epicatequina con sus respectivos controles (MO, HFD, MO + HFD), debido a que son resultados de otro trabajo desarrollado previamente por una alumna de posgrado de nuestra Unidad de investigación, y estos no han sido publicados. Finalmente, no se analizó la expresión de *Elabela*, segundo ligando conocido de APLNR con efectos similares a APLN.

Sin embargo a pesar de estas limitaciones, cabe destacar que hasta la fecha no hay un estudio que haya explorado la expresión de *Apln* y *Aplnr* evaluando el efecto del flavonoide (-)-epicatequina en obesidad con doble estímulo (programación fetal + dieta alta en grasas), por lo que el presente trabajo representa un inicio para explorar esta asociación.

#### **14. CONCLUSIONES**

En tejido cardiaco, el grupo de ratas con doble estímulo e intervención con Epi (MO + HFD + E), muestra incremento significativo en la expresión de *Apln* y del receptor *Aplnr*.

Los grupos C + E, HFD + E y MO + E no mostraron incremento en la expresión de *Apln* e incluso su expresión fue más baja en comparación con el grupo control sin ningún estímulo.

En cuanto al receptor *Aplnr* en tejido cardiaco, además de su incremento en el grupo MO + HFD + E, este se observó también incrementado en el grupo HFD + E, mostrando el efecto tanto de la dieta alta en grasas como de la intervención con Epi.

En tejido adiposo, se observó un importante incremento en la expresión de *Apln* y del receptor *Aplnr* en el grupo MO + E, aunque para ambos genes esta diferencia no alcanzó significancia estadística con el resto de los grupos.

En los grupos HDE + E y MO + HFD + E, se observó incremento en la expresión de *Apln* respecto al grupo control sin ningún estímulo, aunque esta diferencia tampoco fue significativa. El grupo C + E mostró incremento en la expresión tanto de *Apln* como del receptor *Aplnr* con diferencia estadísticamente significativa al comparar con el grupo control sin ningún estímulo.

En el grupo MO + HFD + E, contrario a su incremento en la expresión del ligando *Apln*, la expresión de *Aplnr* se observó marcadamente disminuida respecto al resto de los grupos intervenidos con Epi, sin alcanzar diferencia estadísticamente significativa.

La Epi podría representar una intervención terapéutica de interés con efectos protectores cardiacos y metabólicos para los descendientes de madres con obesidad, que además se desarrollan en un entorno nutricional obesogénico que se acompaña de una dieta alta en grasas.

## 15. REFERENCIAS

- Actis-Goretta, L., A. Leveques, F. Giuffrida, F. Romanov-Michailidis, F. Viton, D. Barron, M. Duenas-Paton, S. Gonzalez-Manzano, C. Santos-Buelga, G. Williamson, et al. 2012. Elucidation of (-)-epicatechin metabolites after ingestion of chocolate by healthy humans. *Free Radical Biology and Medicine* 53 (4):787–95
- Attané C, Foussal C, Le Gonidec S, Benani A, Daviaud D, Wanecq E, Guzmán-Ruiz R, Dray C, Bezaire V, Rancoule C, Kuba K, Ruiz-Gayo M, Levade T, Penninger J, Burcelin R, Pénicaud L, Valet P, Castan-Laurell I. Apelin treatment increases complete Fatty Acid oxidation, mitochondrial oxidative capacity, and biogenesis in muscle of insulin-resistant mice. *Diabetes*. 2012 Feb;61(2):310-20
- Avgerinos KI, Spyrou N, Mantzoros CS, Dalamaga M. Obesity and cancer risk: Emerging biological mechanisms and perspectives. *Metabolism*. 2019 Mar;92:121-135
- Bertrand C, Valet P, Castan-Laurell I. Apelin and energy metabolism. *Front. Physiol.* 2015; 6:115
- Blackmore HL, Niu Y, Fernandez-Twinn DS, Tarry-Adkins JL, Giussani DA, Ozanne SE. Maternal diet-induced obesity programs cardiovascular dysfunction in adult male mouse offspring independent of current body weight. *Endocrinology*. 2014 Oct;155(10):3970-80
- Boucher J, Masri B, Daviaud D, Gesta S, Guigné C, Mazzucotelli A, Castan-Laurell I, Tack I, Knibiehler B, Carpéné C, Audigier Y, Saulnier-Blache JS, Valet P. Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology*. 2005 Apr;146(4):1764-71
- Campos-Nonato I, Galván-Valencia Ó, Hernández-Barrera L, Oviedo-Solís C, Barquera S. Prevalencia de obesidad y factores de riesgo asociados en adultos mexicanos: resultados de la Ensanut 2022. *Salud Publica Mex.* 2023 Jun 14;65:s238-s247
- Cano Martínez et al., *Genes* . Enviado a publicación 2022.
- Castan-Laurell I, Dray C, Knauf C, Kunduzova O, Valet P. Apelin, a promising target for type 2 diabetes treatment? *Trends Endocrinol Metab.* 2012 May;23(5):234-41
- Ceylan-Isik AF, Kandadi MR, Xu X, Hua Y, Chicco AJ, Rwn J, y cols. Apelin administration ameliorates high fat diet-induced cardiac hypertrophy and contractile dysfunction. *J Mol Cell Cardiol.* 2013; 63:4–13
- Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, Kim JI, Kim JB. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016 Apr 13;7:30
- Cobellis L, De Falco M, Mastrogiacomo A, Giraldi D, Dattilo D, Scaffa C. Modulation of apelin and APJ receptor in normal and preeclampsia complicated placentas. *Histol Histopathol.* 2007; 22 (1):1-8

Daviaud D, Boucher J, Gesta S, Dray C, Guigne C, Quilliot D, Ayav A, Ziegler O, Carpene C, Saulnier-Blache JS, Valet P, Castan-Laurell I. TNF $\alpha$  up-regulates apelin expression in human and mouse adipose tissue. *FASEB J*. 2006 Jul;20(9):1528-30

De Jong KA, Barrand S, Wood-Bradley RJ, de Almeida DL, Czeckor JK, Lopaschuk GD, McGee SL. Maternal high fat diet induces early cardiac hypertrophy and alters cardiac metabolism in Sprague Dawley rat offspring. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2018; 28(6):600–609

De los Santos S, García-Pérez V, Hernández-Reséndiz S, Palma-Flores C, González-Gutiérrez CJ, Zazueta C, Canto P, Coral-Vázquez RM. (-)-Epicatechin induces physiological cardiac growth by activation of the PI3K/Akt pathway in mice. *Mol Nutr Food Res*. 2017 Feb;61(2)

De los Santos S, Coral-Vázquez RM, Menjivar M, Granados-Silvestre MDLA, Tejeda ME, Reyes-Castro LA, Méndez JP, Zambrano E, Canto P. (2019). (-)-Epicatechin modifies body composition of the male offspring of obese rats. *Journal of Functional Foods*; 58:367-373

De los Santos S, Reyes-Castro LA, Coral-Vázquez RM, Méndez JP, Leal-García M, Zambrano E, Canto P. (-)-Epicatechin reduces adiposity in male offspring of obese rats. *J Dev Orig Health Dis*. 2020 Feb;11(1):37-43

De los Santos S, Coral-Vázquez RM, Menjivar M, de Los Angeles Granados-Silvestre M, De la Rosa S, Reyes-Castro LA, Méndez JP, Zambrano E, Canto P. (-)-Epicatechin improves body composition of male rats descendant of obese mothers postnatally fed with a high-fat diet. *Fundam Clin Pharmacol*. 2022 Jun;36(3):526-535

De los Santos S, Reyes-Castro LA, Coral-Vázquez RM, Mendez JP, Zambrano E, Canto P. (-)-Epicatechin increases apelin/APLNR expression and modifies proteins involved in lipid metabolism of offspring descendants of maternal obesity. *J Nutr Biochem*. 2023 Jul;117:109350

Dennery PA. Oxidative stress in development: nature or nurture? *Free Radic Biol Med*. 2010; 49(7):1147-51

Dell RB, Holleran S, Ramakrishnan R. Sample size determination. *ILAR J*. 2002;43(4):207-13. doi: 10.1093/ilar.43.4.207. Erratum in: *ILAR J*. 2003;44(3):239

García-Díaz D, Campión J, Milagro FI, Martínez JA. Adiposity dependent apelin gene expression: relationships with oxidative and inflammation markers. *Mol Cell Biochem*. 2007 Nov;305(1-2):87-94

Geurts L, Lazarevic V, Derrien M, Everard A, Van Roye M, Knauf C, Valet P, Girard M, Muccioli GG, François P, de Vos WM, Schrenzel J, Delzenne NM, Cani PD. Altered gut microbiota and

endocannabinoid system tone in obese and diabetic leptin-resistant mice: impact on apelin regulation in adipose tissue. *Front Microbiol.* 2011 Jul 13;2:149

Girault-Sotias PE, Gerbier R, Flahault A, de Mota N, Llorens-Cortes C. Apelin and Vasopressin: The Yin and Yang of Water Balance. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021 Nov 22;12

Gluckman PD, Hanson MA, Spencer HG. Predictive adaptive responses and human evolution. *Trends Ecol Evol.* 2005; (10):527-33

Handy DE, Castro R, Loscalzo J. Epigenetic modifications: basic mechanisms and role in cardiovascular disease. *Circulation.* 2011; 123(19):2145-2156

Hanssens S, Marx-Deseure A, Lecoutre S, Butruille L, Fournel A, Knauf C. Maternal Obesity alters the apelinergic system at the feto-maternal interface. *Placenta.* 2016; 39:41-44

Jensen DM, Damm P., Sorensen B., Molsted Pedersen L., Westergaard JG., Ovesen P., Beck-Nielsen H. Pregnancy outcome and prepregnancy body mass index in 2459 glucose-tolerant Danish women. *Am J Obstet Gynecol.* 2003; 189: 239–244

Kankowski L, Ardissino M, McCracken C, Lewandowski AJ, Leeson P, Neubauer S, Harvey NC, Petersen SE, Raisi-Estabragh Z. The Impact of Maternal Obesity on Offspring Cardiovascular Health: A Systematic Literature Review. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022 May 20;13:868441

King SE, Skinner MK. Epigenetic Transgenerational Inheritance of Obesity Susceptibility. *Trends Endocrinol Metab.* 2020;31(7):478-494

Kralisch S, Lossner U, Bluher M, Paschke R, Stumvoll M, Fasshauer M. Growth hormone induces apelin mRNA expression and secretion in mouse 3T3-L1 adipocytes. *Regul Pept.* 2007 Mar 1;139(1-3):84-9

Lehr, S., Hartwig, S. and Sell, H. (2012) Adipokines: a treasure trove for the discovery of biomarkers for metabolic disorders. *Proteomics Clin. Appl.* 6:91–101

Li B, Yin J, Chang J, Zhang J, Wang Y, Huang H, Wang W, Zeng X. Apelin/APJ relieve diabetic cardiomyopathy by reducing microvascular dysfunction. *J Endocrinol.* 2021 Apr;249(1):1-18

Li C, Cheng H, Adhikari BK, et al. The Role of Apelin-APJ System in Diabetes and Obesity. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:820002

Loche E, Blackmore HL, Carpenter AA, Beeson JH, Pinnock A, Ashmore TJ, Aiken CE, de Almeida-Faria J, Schoonejans JM, Giussani DA, Fernandez-Twinn DS, Ozanne SE. Maternal diet-induced obesity programmes cardiac dysfunction in male mice independently of post-weaning diet. *Cardiovasc Res.* 2018 Aug 1;114(10):1372-1384

Lu L, Wu D, Li L, Chen L. Apelin/APJ system: A bifunctional target for cardiac hypertrophy. *Int J Cardiol.* 2017 Mar 1;230:164-170

Ma, W., P. Waffo-Teguo, M. Jourdes, H. Li, and P.-L. Teissedre. 2018. First evidence of epicatechin vanillate in grape seed and red wine. *Food Chemistry* 259:304–10

Matuszak O, Banach W, Pogorzały B, Muszyński J, Mengesha SH, Bogdański P, Skrypnik D. The Long-Term Effect of Maternal Obesity on the Cardiovascular Health of the Offspring-Systematic Review. *Curr Probl Cardiol.* 2024 Jan;49(1 Pt B):102062

Meydani M, Hasan ST. Dietary polyphenols and obesity. *Nutrients.* 2010 Jul;2(7):737-51  
Mortality. *Physiol Rev.* 2015 Jul;95(3):727-48

Mehri K, Hamidian G, Zavvari Oskuye Z, Nayebirad S, Farajdokht F. The role of apelinergic system in metabolism and reproductive system in normal and pathological conditions: an overview. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2023 Jun 22;14

Munguía Salazar J, 2021. Caracterización de la expresión del sistema apelinérgico de crías F1 de la cepa Wistar alimentadas con dieta control o alta en grasas descendientes de un modelo animal de obesidad. Tesis para optar por el grado de Maestro en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México

Nathanielsz PW, Ford SP, Long NM, Vega CC, Reyes-Castro LA, Zambrano E. Interventions to prevent adverse fetal programming due to maternal obesity during pregnancy. *Nutr Rev.* 2013 Oct;71 Suppl 1(0 1):S78-87

O'Carroll AM, Don AL, Lolait SJ. APJ receptor mRNA expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus: regulation by stress and glucocorticoids. *J Neuroendocrinol* 2003; 15:1095-1101

O'Dowd BF, Heiber M, Chan A, Heng HH, Tsui LC, Kennedy JL, y cols. A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene.* 1993; 136:355-360

Panneerselvam M, Tsutsumi YM, Bonds JA, Horikawa YT, Saldana M, Dalton ND, Head BP, Patel PM, Roth DM, Patel HH. Dark chocolate receptors: epicatechin-induced cardiac protection is dependent on delta-opioid receptor stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010 Nov;299(5):H1604-9

Pang B, Jiang YR, Xu JY, Shao DX, Hao LY. Apelin/ELABELA-APJ system in cardiac hypertrophy: Regulatory mechanisms and therapeutic potential. *Eur J Pharmacol.* 2023 Jun 15;949:175727

Portilla-Martínez A, Ortiz-Flores MÁ, Meaney E, Villarreal F, Nájera N, Ceballos G. (-)-Epicatechin Is a Biased Ligand of Apelin Receptor. *Int J Mol Sci.* 2022 Aug 11;23(16):8962

Purnell JQ. What is Obesity? Definition as a Disease, with Implications for Care. *Gastroenterol Clin North Am.* 2023 Jun;52(2):261-275

Qu Z, Liu A, Li P, Liu C, Xiao W, Huang J, Liu Z, Zhang S. Advances in physiological functions and mechanisms of (-)-epicatechin. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2021;61(2):211-233

Ramirez-Sanchez I, de los Santos S, Gonzalez-Basurto S, Canto P, Mendoza-Lorenzo P, Palma-Flores C, Ceballos-Reyes G, Villarreal F, Zentella-Dehesa A, Coral-Vazquez RM. (-)-Epicatechin improves mitochondrial-related protein levels and ameliorates oxidative stress in dystrophic  $\delta$ -sarcoglycan null mouse striated muscle. *FEBS J*. 2014 Dec;281(24):5567-80

Ramirez-Sanchez I, Maya L, Ceballos G, Villarreal F. (-)-epicatechin activation of endothelial cell endothelial nitric oxide synthase, nitric oxide, and related signaling pathways. *Hypertension*. 2010 Jun;55(6):1398-405

Reynolds LP, Borowicz PP, Caton JS, Crouse MS, Dahlen CR, Ward AK. Developmental Programming of Fetal Growth and Development. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 2019;35(2):229-247

Reynolds RM, Osmond C, Phillips DIW, Godfrey KM. Maternal BMI, Parity, and Pregnancy Weight Gain: Influences on Offspring Adiposity in Young Adulthood. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95 (12):5365–5369

Rodríguez-González GL, Vega CC, Boeck L, Vázquez M, Bautista CJ, Reyes-Castro LA, Saldaña O, Lovera D, Nathanielsz PW, Zambrano E. Maternal obesity and overnutrition increase oxidative stress in male rat offspring reproductive system and decrease fertility. *Int J Obes (Lond)*. 2015 Apr;39(4):549-56

Rodríguez-González GL, De Los Santos S, Méndez-Sánchez D, Reyes-Castro LA, Ibáñez CA, Canto P, Zambrano E. High-fat diet consumption by male rat offspring of obese mothers exacerbates adipose tissue hypertrophy and metabolic alterations in adult life. *Br J Nutr*. 2023 Sep 14;130(5):783-792

Shay, J., H. A. Elbaz, I. Lee, S. P. Zieske, M. H. Malek, and M. H. Uttemann. 2015. Molecular mechanisms and therapeutic effects of (-)-epicatechin and other polyphenols in cancer, inflammation, diabetes, and neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2015:1–13

Szokodi, I, Tavi, P, Földes G, Voutilainen-Myllylä S, Ilves M, Tokola, H. et al. Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ Res*. 2001; 91(5):434-440

Tatemoto K, Takayama K, Zou MX, Kumaki I, Zhang W, Kumano K, y cols. The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul Pept*. 2001; 99(2-3):87-92

Vasudevan C, Renfrew M, McGuire W. Fetal and perinatal consequences of maternal obesity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*. 2011; 96:378-382

Vazquez-Prieto, M. A., A. Bettaieb, C. Rodriguez Lanzi, F. G. Haj, C. G. Fraga, and P. I. Oteiza. 2012. (-)-Epicatechin prevents adipose tissue inflammation in animal and cell models. *Free Radical Biology and Medicine* 53:S8

Vega CC, Reyes-Castro LA, Bautista CJ, Larrea F, Nathanielsz PW, Zambrano E. Exercise in obese female rats has beneficial effects on maternal and male and female offspring metabolism. *Int J Obes (Lond)*. 2015 Apr;39(4):712-9

White CL, Purpera MN, Morrison CD. Maternal obesity is necessary for programming effect of high-fat diet on offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009 May;296(5):R1464-72

Wu H, Cheng XW, Hao C, Zhang Z, Yao H, Murohara T, Dai Q. Regulation of apelin and its receptor expression in adipose tissues of obesity rats with hypertension and cultured 3T3-L1 adipocytes. *Exp Anim*. 2014;63(2):257-67

Yamazaki KG, Romero-Perez D, Barraza-Hidalgo M, Cruz M, Rivas M, Cortez-Gomez B, Ceballos G, Villarreal F. Short- and long-term effects of (-)-epicatechin on myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008 Aug;295(2):H761-7

Yue P, Jin H, Xu S, Aillaud M, Deng AC, Azuma J y cols. Apelin Decreases Lipolysis via G(q), G(i), and AMPK-Dependent Mechanisms. *Endocrinology* 2011; 152 (1):59-68

Zambrano E, Martínez-Samayoa PM, Rodríguez-González GL, Nathanielsz PW. Dietary intervention prior to pregnancy reverses metabolic programming in male offspring of obese rats. *J Physiol*. 2010 May 15;588(Pt 10):1791-9

Zhen EY, Higgs RE, Gutierrez JA. Pyroglutamyl apelin-13 identified as the major apelin isoform in human plasma. *Anal Biochem*. 2013; 442(1):1-9