

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS DE LA HABANA
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS Y PRECLÍNICAS “VICTORIA DE GIRÓN”
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

EFFECTO DE LA OBESIDAD INDUCIDA POR GLUTAMATO MONOSÓDICO EN
RATAS WISTAR Y SU DESCENDENCIA

Tesis presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias Médicas.

Autor: Dra. Gipsis Suárez Román

Tutor: Sonia Clapés Hernández, Ingeniera Química, Profesora Titular,
Doctora en Ciencias de la Salud.

La Habana

2017

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mi tutora por su guía acertada y consejos oportunos.

Al jefe del departamento de Bioquímica Profesor Dr. Rolando A. Hernández Fernández, DrC. Tammy Fernández Romero y demás profesores de este departamento. Mención especial para los técnicos Liduvina Rodríguez Campos, Estervina Abreu García, Tania O. Castro Martínez, Mayda González Bello y Osmar Carbonell Wilson. Gracias por su contribución directa o indirecta a los resultados de este trabajo.

A Víctor M. Rodríguez, Heberto A. Domínguez, Carlos A. Purón, Alexei Cabrera, Maylín Soca y personal técnico del departamento de cirugía experimental del ICBP “Victoria de Girón” por su importante participación en este trabajo.

A las profesoras Nínive Núñez López, Claudia Joffre, Laymit Alonso y las técnicas Miriam León y María C. Morales del departamento de Embriología por su vital contribución.

A los doctores Alfredo Jesús Perera Calderín y Sonya García Calcedo que colaboraron durante la realización de sus trabajos de terminación de residencia.

A la profesora Marta Herrera Álvarez por su colaboración con el manejo y cuidado de los animales.

Al Profesor Esteban Egaña Morales por su contribución al análisis estadístico de los resultados de esta investigación.

A los trabajadores del Bioterio del ICBP “Victoria de Girón”

A Tatiana Acosta y María de los Angeles Rodríguez y demás trabajadores del departamento de Laboratorio clínico del Centro Nacional de Genética Médica por su colaboración en el procesamiento de muestras.

A la compañera Celeste Arranz, del Instituto de Endocrinología por su ayuda con el procesamiento de muestras.

A la profesora Débora Cristina Damasceno, Universidad Estatal Paulista (UNESP) de Brasil y al profesor Guillermo Sáez Tormo, Universidad de Valencia, España por todo lo aprendido en mi estancia en sus respectivos laboratorios.

DEDICATORIA

A mi familia por todo su apoyo y sacrificio durante todo este tiempo: mi madre Lucía Román Altemán, mi hija Keyla Bárbara Peña Suárez, mi esposo Rey Yordanis Peña Torres, mi hermana Yareilmy Suárez Román y mis sobrinos (Kleidy y Kendry Carrillo Suárez).

A mis seres queridos que hoy ya no están presentes pero que los llevo en mi corazón cada momento (mis abuelos maternos y mi padre).

A mis amigas Dianelis, Yulinda y Kenia con sus respectivas familias que siempre me han apoyado en todo.

SINTESIS

La obesidad pregestacional produce efectos adversos sobre la madre y su descendencia, como el incremento del riesgo de malformaciones congénitas cuya causa se desconoce. No se tiene referencia de investigaciones en modelos animales que reproduzcan este fenómeno. El estrés oxidativo podría constituir un posible factor causal. Esta investigación toma en cuenta esta teoría y evalúa las consecuencias de la obesidad visceral inducida por glutamato monosódico sobre la madre y su descendencia durante la etapa prenatal.

Se utilizaron ratas Wistar hembras hechas obesas por glutamato monosódico (4mg/g de peso corporal) aplicando un esquema de administración previamente seleccionado en esta investigación. Las ratas controles y obesas fueron gestadas y mantenidas hasta el día 11,5 o 20 para el estudio del período embrionario o fetal respectivamente. En las ratas obesas aumentaron los niveles de triacilgliceroles, lípidos oxidados, las malformaciones y retrasos embrionarios, así como las muertes fetales. Se incrementaron las proteínas oxidadas en embriones y placentas. El crecimiento embrionario y fetal disminuyó en los animales obesos. La presencia de malformaciones se asoció a bajos niveles maternos de glutatión reducido.

Con esta investigación se aporta un sistema experimental que incluye una metodología para la detección de anomalías congénitas que puede ser empleado en futuras investigaciones sobre obesidad y preñez en ratas. Se proporcionan evidencias del efecto nocivo de la obesidad visceral sobre el desarrollo prenatal, fundamentalmente del riesgo de malformaciones congénitas.

ÍNDICE

	Pág
INTRODUCCIÓN	1
Problema práctico.....	4
Preguntas científicas.....	5
Objetivos.....	5
Diseño general del estudio.....	6
Novedad.....	7
Aporte.....	8
1. FUNDAMENTO TEÓRICO	9
1.1 Principales alteraciones metabólicas en la obesidad.....	11
1.1.1 Expansión del tejido adiposo.....	11
1.1.2 Resistencia a la insulina.....	12
1.1.3 Resistencia a la leptina.....	14
1.1.4 Alteraciones en el perfil lipídico sérico.....	15
1.2 Obesidad y estrés oxidativo.....	16
1.2.1 Especies reactivas del oxígeno.....	16
1.2.2 Antioxidantes.....	17
1.2.3 Daño a biomoléculas por especies reactivas del oxígeno.....	19
1.2.4 Estrés oxidativo inducido por la obesidad.....	22
1.3 Adaptaciones metabólicas durante la gestación normal y en la obesidad	26
1.3.1 Estrés oxidativo y anomalías congénitas.....	29

1.4 Modelos animales de obesidad.....	31
1.4.1 Obesidad inducida por glutamato monosódico.....	32
2. MATERIALES Y MÉTODOS	35
2.1 Tipo de investigación.....	35
2.2 Consideraciones éticas.....	35
2.3 Diseño general del estudio.....	35
2.4 Descripción de las tareas de investigación.....	36
2.4.1 Tarea de investigación 1.....	36
2.4.2 Tareas de investigación 2 y 3.....	38
2.5 Condiciones ambientales.....	42
2.6 Procesamiento de las muestras.....	42
2.6.1 Ratas con 11,5 días de gestación.....	42
2.6.2 Embriones.....	44
2.6.3 Ratas con 20 días de gestación.....	45
2.6.4 Fetos.....	45
2.6.5 Placentas.....	49
2.7 Variables que se determinaron.....	49
2.8 Control de los sesgos del diseño.....	58
2.9 Control de la calidad del análisis de las variables.....	58
2.10 Procesamiento estadístico.....	58
3. RESULTADOS	59
3.1 Tarea de Investigación 1.....	59

3.2 Tarea de Investigación 2 y 3.....	61
3.2.1 Ratas con 11,5 días y 20 días de gestación.....	61
3.2.2 Descendencia de ratas con 11,5 días de gestación.....	68
3.2.3 Descendencia de ratas con 20 días de gestación.....	72
3.2.4 Placentas de ratas con 20 días de gestación.....	75
3.3 Resumen de los principales resultados.....	75
4. DISCUSIÓN	77
CONCLUSIONES	99
RECOMENDACIONES	100
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	101
BIBLIOGRAFÍA	104
ANEXOS	121

ABREVIATURAS:

AGNE: ácidos grasos no esterificados

AgRP: péptido relacionado con Agouti

PKB: proteína kinasa B

ALAT: alanino aminotransferasa

AMPK: proteína kinasa dependiente de AMP

BHE: barrera hemato-encefálica

BHT: butilato de hidroxitolueno

CART: transcriptos regulados por cocaína y anfetamina

CAT: catalasa

CoQ: coenzima Q o ubiquinona

DAG: diacilglicerol

DTN: defectos del cierre del tubo neural

EDTA: ácido etilendiamino tetracético

ERO: especies reactivas del oxígeno

FTO: proteína asociada a la obesidad visceral, del inglés fat mass and obesity associated

IKK: proteína kinasa del inhibidor del factor nuclear-kappa B

JNK: proteína kinasa del dominio N-terminal de la proteína c-Jun

GLUT: transportador de glucosa

GMS: glutamato monosódico

GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas

GPx: glutatión peroxidasa

GR: glutatión reductasa

GSH: glutatión reducido

HDL: lipoproteína de alta densidad, del inglés high density lipoprotein

HNE: 4-hidroxi-trans-2-nonenal

11 β -HSD1: 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa 1

HOMA: modelo homeostático de Mathews para determinar resistencia a la insulina, del inglés homeostasis model assessment of insulin resistance

IL: interleukina

IMC: índice de masa corporal

IP₃: inositol trisfosfato

IRS: sustrato del receptor de la insulina

JAK: kinasas Jano

LDL: lipoproteína de baja densidad, del inglés low density lipoprotein

LH: hormona luteinizante

MCP: proteína quimiotáctica de monocitos

MCR: receptor de melanocortina

MDA: malonildialdehído

MMI: membrana mitocondrial interna

MSH: hormona alfa estimulante de melanocitos

MTP: proteína del retículo endoplásmico que transfiere triacilglicerol, del inglés microsomal triglyceride transfer protein.

NADPH: nicotin adenin dinucleótido fosfatado reducido

NF-κB: factor nuclear- kappa B

NMDAR: receptores N-metil-D- aspartato

NPY: neuropéptido Y

eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

PAOP: productos avanzados de la oxidación de proteínas

PDI: proteína disulfuro isomerasa

PFD: productos de fragmentación de la dexosirribosa

8-epi-PGF2α: 8-epi-prostaglandina F2 alfa

PKC: proteína kinasa C

PMSF: fenilmetil sulfonil fluoruro

POMC: pro-opiomelanocortina

PON: paraoxonasa

PPARγ: receptor gamma activado del proliferador de peroxisomas, del inglés

peroxisome proliferator activator receptor gamma

PRX: peroxirredoxinas

PTP1B: fosfotirosil proteína fosfatasa 1B

Redd1: proteína 1 regulada por el desarrollo y la respuesta al daño al ADN, del

inglés regulated in development and DNA-damage responses 1

RE: retículo endoplásmico

SDS: dodecil sulfato de sodio

SOCS3: supresor 3 de la señalización de citokinas

SOD: superóxido dismutasa

TAG: triacilgliceroles

TNF: factor de necrosis tumoral

mTOR: proteína blanco de la rapamicina, del inglés mechanistic target of rapamycin

Trx: tiorredoxinas

UCP1: proteína desacopladora 1, del inglés uncoupled protein 1

VLDL: lipoproteína de muy baja densidad, del inglés very low density lipoprotein

XBP1: proteína de unión al motivo X, del inglés X-box binding protein 1

INTRODUCCIÓN

La obesidad constituye uno de los principales problemas de salud al nivel mundial, considerándose como una pandemia. Se ha estimado que el sobrepeso y la obesidad causan 3,4 millones de muertes anuales, 3,9 % de años de vida potencial perdidos y el 3,8 % de discapacidad ajustada a los años de vida. Tanto en países desarrollados como aquellos en vías de desarrollo se ha observado un incremento significativo de individuos obesos. En 2013, la proporción de adultos con índice de masa corporal (IMC) ≥ 25 Kg/m² era de 38 % en mujeres y de 36,9 % en hombres al nivel mundial¹.

En Cuba la prevalencia de sobrepeso y obesidad en la población total tiene un valor de 29,8 % y 13,7 % respectivamente, mientras que la obesidad extrema o mórbida es de 1,3 %. El porcentaje de mujeres obesas es superior al de los hombres (16,5 % vs 10,8 %)².

La obesidad, particularmente la visceral o central, constituye un factor de riesgo principal para varias enfermedades tales como diabetes mellitus tipo 2, hipertensión arterial, aterosclerosis, alteraciones en el metabolismo lipídico y cáncer³⁻⁷. La epidemia es especialmente pronunciada en mujeres en edad fértil, a las que afecta su capacidad reproductora e incrementa el riesgo de complicaciones durante la gestación. La obesidad materna se asocia a infertilidad, abortos espontáneos, hipertensión inducida por la gestación, diabetes gestacional, nacimiento por cesárea, parto pretérmino, infección y hemorragia posparto^{8,9}.

La obesidad pregestacional (IMC ≥ 30 previo al momento de la concepción)⁸ también trae consecuencias sobre el producto de la concepción. La muerte fetal y neonatal, así como la macrosomía tienen una mayor prevalencia en mujeres obesas^{8,10-12}. Hay

evidencia de que la obesidad materna altera el neurodesarrollo de la descendencia¹². Por otra parte, los hijos de madres obesas tienen mayor riesgo de desarrollar en la adultez obesidad, diabetes mellitus tipo 2 y enfermedades cardiovasculares. La predisposición a estas enfermedades del adulto es lo que ha dado en llamarse “programación de la vida adulta en el medio intrauterino¹³”.

Las estadísticas del Sistema Nacional de Salud muestran que las malformaciones congénitas se encuentran dentro de las primeras causas de muerte en los menores de 14 años¹⁴. Del año 2008 a la fecha cuatro importantes metaanálisis han demostrado asociación entre la obesidad pregestacional y la aparición de malformaciones congénitas en la descendencia, especialmente los defectos del cierre del tubo neural (DTN) y los defectos cardíacos¹⁵⁻¹⁸. Un estudio recién publicado, llevado a cabo por profesores del departamento de Bioquímica del ICBP “Victoria de Girón” en colaboración con el Centro Nacional de Genética Médica corrobora que estas anomalías congénitas son las más frecuentemente observadas en la descendencia de las obesas en Cuba¹⁹.

La causa del incremento de malformaciones congénitas en los hijos de madres obesas no está aún dilucidada. La mayoría de los trabajos con modelos animales centran su atención en los efectos posnatales sobre la descendencia de madres obesas o sometidas a dietas hipercalóricas^{13,20-25}. Prenatalmente, el período fetal ha sido más estudiado^{13,26-30} que el embrionario³¹. El análisis del efecto de la obesidad sobre el crecimiento embrionario y fetal ha sido una constante en estos estudios^{13,26-31}. Sin embargo, no se tiene referencia de investigaciones con modelos animales de obesidad en los que se determine la presencia de anomalías congénitas en la descendencia³²,

con el uso de técnicas comúnmente destinadas a ese fin³³⁻³⁶. Este hecho ha obstaculizado el hallazgo de los posibles mecanismos fisiopatogénicos subyacentes, así como la evaluación de intervenciones terapéuticas encaminadas a la prevención o disminución de este serio problema de salud.

Muchas de las enfermedades asociadas con la obesidad tienen en común presentar un estado de estrés oxidativo^{3,5-7}. En el 2003 aparece publicada una investigación que mostró correlación positiva entre el IMC y un marcador de estrés oxidativo sistémico: los niveles urinarios de 8-epi-prostaglandina F2 alfa (8-epi-PGF2 α). Se encontró asociación entre el área grasa visceral abdominal y los niveles urinarios de 8-epi-PGF2 α , indicador de daño oxidativo a lípidos³⁷.

Otros trabajos más recientes tanto en humanos como en animales han constatado el ambiente prooxidante en la obesidad^{38,39}. También se han realizado investigaciones que evalúan el estado redox en mujeres obesas gestadas⁴⁰⁻⁴³, pero no se dispone de información en modelos experimentales de obesidad y preñez.

Es notorio que el patrón de malformaciones congénitas entre la descendencia de las mujeres diabéticas y obesas sea bastante común^{15-18,44}. Dado que el estrés oxidativo se esgrime como una de las causas de la embriopatía diabética⁴⁴, pudiera ser también un factor causal en la aparición de anomalías congénitas en los hijos de madres obesas.

Se hace necesario fomentar las investigaciones con modelos animales, en las que se realice un análisis integral del problema. Ello implica la evaluación del efecto de la obesidad sobre la madre, el embrión, el feto y el desarrollo placentario. Se requiere profundizar en los mecanismos de inducción de complicaciones en el producto de la

concepción, específicamente los relacionados con las anomalías congénitas inducidas por la obesidad materna. Todo lo anterior permitirá desarrollar estrategias terapéuticas que contribuyan a lograr un embarazo exitoso.

La obesidad inducida por glutamato monosódico (GMS) constituye un modelo de obesidad visceral y los animales experimentan alteraciones metabólicas que se describen en la obesidad tales como resistencia a la insulina y leptina, intolerancia a la glucosa, alteraciones del metabolismo lipídico y acumulación ectópica de lípidos⁴⁵. Este es el tipo de obesidad que en humanos fundamentalmente se asocia a las comorbilidades vinculadas a la obesidad⁴. Además, existen individuos normopeso ($IMC < 25 \text{ Kg/m}^2$) "*metabólicamente obesos*" los cuales desarrollan resistencia a la insulina, dislipidemia entre otras manifestaciones metabólicas e individuos obesos ($IMC > 30 \text{ Kg/m}^2$) "*metabólicamente sanos*" sin alteraciones metabólicas. El factor clave que marca la diferencia entre estos es el exceso de tejido adiposo visceral⁴. Por tanto, el modelo de obesidad inducido por GMS pudiera reproducir complicaciones de la obesidad pregestacional como son las anomalías congénitas.

Problema Práctico:

La obesidad afecta un alto porcentaje de mujeres en edad reproductora⁸. Varios estudios epidemiológicos han demostrado asociación entre la obesidad pregestacional y la aparición de malformaciones congénitas en la descendencia sin que se conozca por completo la causa de esta asociación¹⁵⁻¹⁹. No se tiene referencia de investigaciones en modelos animales de obesidad y preñez que reproduzcan este fenómeno³², lo cual impide avanzar en el conocimiento de los posibles mecanismos causales subyacentes.

Preguntas científicas

¿La obesidad pregestacional perturbará el crecimiento y desarrollo embrionario, fetal y de la placenta?

¿Las ratas obesas presentaran alteraciones metabólicas y del balance redox durante la gestación?

¿Tendrán las ratas obesas disminuida su capacidad reproductora?

Si la obesidad pregestacional incrementa el riesgo de anomalías congénitas en la descendencia. ¿Guardará esto relación con estrés oxidativo materno?

Objetivos:

General:

Evaluar las consecuencias de la obesidad inducida por glutamato monosódico sobre la madre y su descendencia durante la etapa prenatal.

Específicos:

1. Seleccionar un esquema de administración de glutamato monosódico para inducir obesidad en ratas Wistar.
2. Evaluar la influencia de la obesidad pregestacional sobre el estado metabólico, la capacidad antioxidante y el daño oxidativo a biomoléculas en ratas Wistar , su descendencia y la placenta.
3. Evaluar la influencia de la obesidad pregestacional sobre la capacidad reproductora en ratas Wistar.
4. Evaluar la influencia de la obesidad pregestacional sobre el desarrollo embrionario, fetal y placentario.

5. Determinar si existe relación entre la presencia de anomalías congénitas en la descendencia de ratas obesas y el estado redox sistémico materno.

Diseño general del estudio:

Para dar cumplimiento al objetivo 1 se desarrolló la tarea de investigación 1:

Tarea de investigación 1. Selección del esquema de administración para inducir obesidad por el glutamato monosódico en ratas Wistar

Se procedió a inyectar una única dosis de GMS (4mg/g de peso corporal/día) a ratas Wistar recién nacidas de madres sanas. Se probaron 8 esquemas de administración diferentes en los cuales se modificó i) la vía de administración (subcutánea o intraperitoneal), ii) el número de dosis (5 o 7 dosis), iii) la frecuencia de la administración (diario o en días alternos) y iv) el día de comienzo de la administración del GMS (día 1 o día 2 de vida). A otro grupo de ratas Wistar neonatas (controles) se les suministró cloruro de sodio al 0,9 % bajo las mismas condiciones explicadas. A los 90 días se realizó el diagnóstico de obesidad mediante el índice de Lee⁴⁶. Para la selección del esquema de administración se tuvo en cuenta las siguientes variables: índice de Lee⁴⁶, frecuencia de obesidad y la mortalidad neonatal.

Para alcanzar los objetivos 2 al 5 fueron diseñadas las tareas de investigación 2 y 3

Tarea de investigación 2. Evaluación de la influencia de la obesidad pregestacional inducida por glutamato monosódico en ratas sobre el desarrollo embrionario

Ratas Wistar al momento del nacimiento fueron divididas aleatoriamente en dos grupos: uno al que se le administró GMS (4 mg/g de peso corporal/día) aplicando el esquema de administración seleccionado en la tarea de investigación 1; al otro grupo se le inyectó NaCl 0,9 % siguiendo igual esquema. A los 90 días, las ratas fueron

clasificadas como obesas y controles. Se comenzó el apareamiento con machos sanos de la misma cepa, designándose como 0 (cero) el primer día de la gestación.

A los 11,5 días de gestación se realizó la eutanasia de los animales. Se recolectó sangre, tejidos hepático y adiposo para determinaciones bioquímicas. Se determinaron variables reproductivas. Los embriones fueron analizados morfológicamente y se determinaron marcadores bioquímicos en embriones homogeneizados.

Tarea de investigación 3. Evaluación de la influencia de la obesidad pregestacional inducida por glutamato monosódico en ratas sobre el desarrollo fetal y placentario

Se siguió el mismo procedimiento descrito en la tarea de investigación 2. La eutanasia fue ejecutada el día 20 de la gestación, de acuerdo con el período que se analiza. Se recolectó sangre, tejidos hepático y adiposo para determinaciones bioquímicas y se determinaron variables reproductivas. Se llevó a cabo el estudio morfológico de los fetos y las placentas. Se determinaron marcadores bioquímicos en placentas homogeneizadas.

Novedad:

Se evalúa en conjunto las consecuencias de la obesidad para la madre, la placenta y el producto de la concepción en diferentes etapas del desarrollo. No se tiene antecedentes de la aplicación del modelo de obesidad inducido por GMS en este tipo de estudios. Por otra parte, se aplica una metodología que recopila varias técnicas que permiten la detección de anomalías congénitas tanto en período embrionario como fetal y no se tiene referencia de su uso en modelos experimentales de obesidad y preñez (Figura 1).

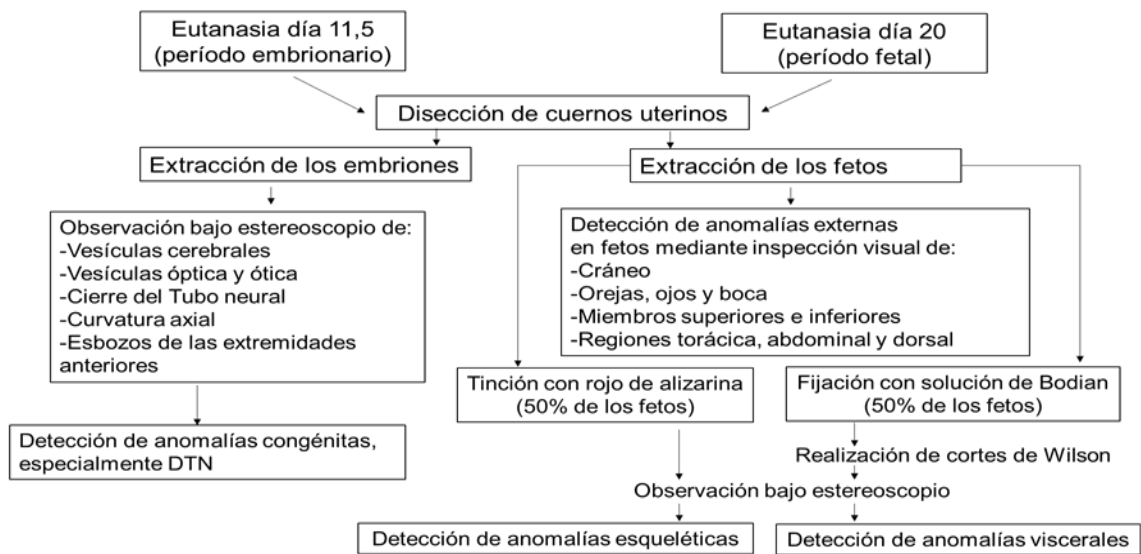


Figura 1: Metodología para la detección prenatal de anomalías congénitas en ratas. DTN: defectos del cierre del tubo neural.

Aporte:

A partir de esta investigación se cuenta con un sistema experimental que incluye una metodología para la detección de anomalías congénitas que puede ser empleado en futuras investigaciones sobre obesidad y preñez en ratas. Se aporta evidencias del riesgo de la obesidad para el desarrollo de anomalías congénitas, fundamentalmente los defectos del cierre del tubo neural. También se proporciona evidencias de estrés oxidativo generado por la obesidad materna lo que permite en venideros trabajos profundizar en la contribución del estrés oxidativo en complicaciones de la obesidad materna.

Los resultados de este trabajo tienen gran impacto social al constituir una alerta a las autoridades sanitarias sobre la necesidad de desarrollar estrategias encaminadas a lograr que las mujeres en edad reproductora alcancen un peso adecuado antes de la concepción. Lo anterior contribuirá a mejorar la salud de las madres y de su descendencia.

1. FUNDAMENTO TEÓRICO

1. FUNDAMENTO TEÓRICO

La obesidad se define como un exceso de grasa corporal que pudiera afectar negativamente la salud de un individuo⁶. La mayoría de las veces se manifiesta por un peso corporal superior al considerado como normal⁴⁷. Se precisa que no es la masa grasa total, sino un exceso de grasa en determinadas localizaciones^{3,4}.

La acumulación de grasa intra-abdominal u obesidad visceral, es tan o más importante que la grasa corporal total en la predicción de las complicaciones que tradicionalmente han sido asociadas con la obesidad. El síndrome metabólico, diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares, alteraciones en el metabolismo lipídico, enfermedad de hígado graso no alcohólica, aterosclerosis y algunos tipos de cáncer se encuentran entre dichas complicaciones^{3,4}.

La enfermedad es un estado que se genera por desbalance energético derivado de una ingesta excesiva de calorías por encima del consumo del organismo⁴⁷. Los estilos de la vida moderna caracterizados por dietas con alto contenido calórico, conjuntamente con la disminución de la actividad física han provocado el aumento alarmante de esta enfermedad. A esto también han contribuido los cambios en la microbiota intestinal¹.

Existen mecanismos neurohumorales complejos que controlan el equilibrio energético mediante la regulación del apetito y la saciedad (Anexo 1). Estos pueden dividirse, de manera simplificada, en tres componentes^{47,48}:

1) El sistema periférico o aferente que genera señales procedentes de varias localizaciones. Sus principales componentes son leptina y adiponectina producidas

por el tejido adiposo, grelina del estómago, péptido YY del íleon y el colon e insulina y amilina del páncreas^{47,48}.

2) El sistema central (núcleo arqueado del hipotálamo) el cual procesa e integra las señales periféricas neurohumorales y genera señales eferentes. Contiene dos subgrupos de neuronas de primer orden: neuronas anorexigénicas que producen pro-opiomelanocortina (POMC) y transcriptos regulados por cocaína y amfetamina (CART) y neuronas orexigénicas que contienen neuropéptido Y (NPY) y péptido relacionado con Agouti (AgRP). Estas neuronas de primer orden se comunican con neuronas de segundo orden^{47,48}.

Las neuronas POMC/CART causan disminución del apetito, intensifican el gasto de energía y la pérdida de peso mediante la producción de hormona alfa estimulante de melanocitos (MSH) y la activación de los receptores de melanocortina 3 y 4 (MC3/4R) en las neuronas de segundo orden. Las neuronas NPY/AgRP promueven la ingesta alimentaria y la ganancia de peso mediante activación de los receptores Y1/5 en las neuronas de segundo orden^{47,48}.

3) El sistema eferente, el cual lleva las señales generadas en las neuronas de segundo orden del hipotálamo para controlar la ingesta alimentaria y el gasto de energía. El sistema hipotalámico también se comunica con centros del prosencéfalo y el mesencéfalo que controlan el sistema nervioso autónomo^{47,48}.

La obesidad se origina por un trastorno en los mecanismos que controlan el peso corporal. Su patogenia es multifactorial, extremadamente compleja, y aún no se comprende completamente. Involucra factores genéticos, epigenéticos, socioeconómicos, culturales, étnicos y políticos⁴⁷. Los estudios de asociación del genoma global han permitido identificar variantes genéticas que predisponen a la

obesidad y a complicaciones ligadas a esta en genes cuyos productos intervienen en el control del balance energético y el metabolismo como proteína asociada a la obesidad visceral (FTO), MC3R, MC4R, POMC y otros. Las interacciones genes-ambiente pueden conducir a alteraciones metabólicas y a obesidad como consecuencia de cambios epigenéticos que alteran la expresión de los genes mencionados sin modificación de la secuencia de ADN^{49,50}.

Cuando la ingesta calórica excede el gasto de energía, se generan respuestas celulares adversas ante la exposición continuada al exceso de nutrientes. Esto ocurre en muchos tipos de células (adipocitos, células endoteliales y musculares, hepatocitos, macrófagos y monocitos), generándose disfunción metabólica³.

La obesidad, particularmente la visceral, conduce o se asocia a un grupo de alteraciones metabólicas como la resistencia a la insulina y a la leptina, la expansión del tejido adiposo disfuncional, el almacenamiento ectópico de lípidos, modificaciones en el perfil lipídico sérico, liberación de citocinas proinflamatorias y estrés oxidativo. Estas alteraciones metabólicas son las que hacen de la obesidad un factor de riesgo principal de las entidades nosológicas mencionadas al inicio de este acápite^{3,4,6,47,50}.

1.1 Principales alteraciones metabólicas en la obesidad

1.1.1 Expansión del tejido adiposo: es consecuencia de la hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos. Tras la ingesta de alimentos se incrementan los niveles de glucosa sanguínea, lo cual constituye una señal para la liberación de insulina por el páncreas que activa la lipogénesis en el tejido adiposo^{3,4,6}. La estimulación de la lipogénesis favorece la acumulación intracelular de triacilgliceroles (TAG) que conduce a hipertrofia de los adipocitos. Las dietas ricas en grasa estimulan la

expresión del receptor gamma activado del proliferador de peroxisomas (PPAR γ), que tiene como ligandos naturales a los ácidos grasos y sus derivados. El PPAR γ contribuye al almacenamiento de energía al potenciar la adipogénesis⁵¹.

Los TAG son almacenados en vesículas lipídicas del tejido adiposo. Las vesículas lipídicas están constituidas por una monocapa de fosfolípidos y proteínas específicas, la cual rodea a un núcleo central hidrofóbico de TAG y ésteres de colesterol. Las proteínas perilipinas, se localizan en la superficie de las vesículas lipídicas y actúan como una barrera física que impide el acceso de las lipasas a los TAG en condiciones basales⁵².

En el adipocito hipertrofiado el sellado de la superficie de las vesículas por las perilipinas es defectuoso, todo lo cual promueve la liberación de ácidos grasos no esterificados (AGNE) hacia la circulación, su incremento en el plasma y la acumulación ectópica de lípidos^{4,53,54}. El aumento de los AGNE en el plasma se ha relacionado con el incremento del IMC⁵⁵ y con el aumento de la grasa visceral^{4,50}.

1.1.2 Resistencia a la insulina: se define como la capacidad disminuida de la insulina para estimular la captación de glucosa en tejidos periféricos o la incapacidad de la insulina para impedir la liberación de glucosa por el hígado^{56,57}. Predispone al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2. La hipertrofia del adipocito conduce a la disminución del número de receptores para la insulina por área de superficie, lo cual contribuye al estado de resistencia a la hormona. Se requerirá mayor concentración de la insulina para provocar un determinado efecto metabólico^{56,57}.

Los AGNE y metabolitos derivados [ceramidas, N-aciletanolaminas, diacilglicerol (DAG) y acil-Coenzima A] activan a seril/treonil proteínas kinasas tales como

isoformas no convencionales de la proteína kinasa C- θ, ϵ, δ (PKC), proteína kinasa del inhibidor del factor nuclear-kappa B (IKK) y proteína kinasa del dominio N-terminal de la proteína c-Jun (JNK). Estas enzimas fosforilan al receptor de la insulina o al sustrato 1/2 del receptor de la insulina (IRS1/2), bloqueando la acción de esta hormona. De esta forma los AGNE y metabolitos derivados inducen resistencia a la insulina⁵⁶⁻⁵⁹.

Las ceramidas en particular activan a la fosfotirosil proteína fosfatasa 2A, la que desfosforila e inactiva a la proteína kinasa B (PKB). Esta proteína participa en la vía por medio de la cual ocurre la translocación de los transportadores 4 de glucosa (GLUT4) hacia la membrana plasmática por lo que su inactivación disminuye la captación de glucosa⁶⁰.

El estrés mecánico debido a acumulación ectópica de lípidos, la hipoxia relativa por hipertrofia de los adipocitos, así como el incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) imponen tensión sobre la maquinaria del retículo endoplasmico (RE), generando una respuesta de estrés, denominada "Respuesta a proteínas desplegadas"^{61,62}. Como consecuencia se activan seril/treonil proteínas kinasas tales como JNK e IKK, causando resistencia a la insulina por un lado y aumento de la expresión de citocinas proinflamatorias por el otro. Es por ello que la obesidad se considera como un estado inflamatorio crónico^{61,62}.

Las citocinas proinflamatorias [factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), interleukina-1 beta (IL-1 β), IL-6, proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) y otras] son segregadas por adipocitos y macrófagos que infiltran el tejido adiposo de obesos. Estas citocinas agravan la resistencia a la insulina, ya que las mismas pueden estimular directamente a las seril/treonil proteínas kinasas mencionadas

anteriormente^{7,60-62}. El TNF α además disminuye los niveles de perilipinas contribuyendo a la liberación de AGNE hacia el plasma⁵³.

La obesidad se acompaña de disminución de algunas adipocinas como la adiponectina, mientras aumenta la liberación de resistina y vifastina. Estas últimas ejercen un efecto prooxidante, proinflamatorio y causan resistencia a la insulina. Contrariamente, la adiponectina incrementa la sensibilidad a la insulina. Tiene potentes efectos antiinflamatorios, antioxidantes y antiaterogénicos. La producción elevada de citocinas proinflamatorias (TNF α e IL-6) en los adipocitos inhibe la síntesis y secreción de adiponectina y contruye al estado de resistencia a la insulina^{4,7}.

1.1.3 Resistencia a la leptina: los mecanismos exactos que conducen a resistencia a la leptina con la consecuente hiperleptinemia aún no están esclarecidos. Dentro de los mecanismos probables que han sido postulados se encuentran: la disminución de la capacidad de la barrera hemato-encefálica (BHE) de transportar la leptina hacia el cerebro y de la expresión de receptores de leptina, fundamentalmente los que tienen el dominio citosólico corto que se encargan de la eliminación del exceso de la hormona. También se invoca la sobreexpresión de SOCS3 (supresor 3 de la señalización de citocinas) el cual bloquea la unión de JAK2 (kinasa Jano 2) al receptor de leptina y de PTP1B una fosfotirosil proteína fosfatasa que desfosforila a JAK2 inhibiendo la señalización mediada por la leptina^{63,64}.

La hiperleptinemia incrementa el riesgo de aterosclerosis y de enfermedades cardiovasculares. Esto es debido a que conduce a hiperactividad simpática renal, provocando vasoconstricción periférica, aumento de la reabsorción tubular de

sodio y consecuentemente hipertensión arterial. Además, tiene efectos prooxidantes y proinflamatorios que causan disfunción endotelial. Por otra parte, estimula la agregación plaquetaria, la proliferación de las células musculares lisas de los vasos sanguíneos e hipertrofia de los cardiomiocitos^{63,64}.

1.1.4 Alteraciones en el perfil lipídico sérico: La obesidad visceral se acompaña de altos niveles de TAG y VLDL, bajos niveles de HDL-colesterol, niveles altos o normales de colesterol total y LDL-colesterol, siendo las partículas de LDL más pequeñas y densas que lo normal. Como consecuencia del aumento de las VLDL en la circulación se produce intercambio de lípidos entre las VLDL, las HDL y las LDL. Las VLDL le transfieren TAG y a su vez las HDL y LDL le pasan ésteres de colesterol. Las partículas de LDL y HDL ricas en TAG formadas son buenos sustratos de la TAG lipasa hepática que les degrada estos lípidos y las torna más pequeñas. Las HDL más pequeñas son sensibles a la degradación por lo que aumenta su eliminación del plasma y disminuye su concentración⁴.

Las LDL pequeñas y densas son aterogénicas. Varios factores contribuyen a la aterosclerosis. Primero, las partículas de LDL pequeñas se unen menos eficientemente al receptor de LDL, su ruta normal de eliminación, con lo cual permanecen más tiempo en la circulación. La resistencia a la insulina favorece la permanencia en la circulación por reducción de la capacidad de la insulina de estimular la expresión del receptor de LDL. Segundo, se producen cambios conformacionales en la apolipoproteína B sobre la superficie de las LDL pequeñas que hace que interactúen con mayor probabilidad con el endotelio vascular. La retención y el menor tamaño de esas partículas facilitan su penetración dentro de la pared arterial. Tercero, las LDL pequeñas y densas son muy susceptibles a la

modificación química (oxidación) una vez dentro de la pared arterial. Cuarto, los macrófagos residentes reconocen y captan a las LDL modificadas transformándose en células espumosas. La formación de células espumosas es un paso inicial en el desarrollo de la placa aterosclerótica⁴.

1.2 Obesidad y estrés oxidativo

Se plantea que el estrés oxidativo es el mecanismo subyacente común de las comorbilidades relacionadas con la obesidad. El estrés oxidativo se define clásicamente como un desbalance entre la producción de especies reactivas del oxígeno y los mecanismos de defensa antioxidantes, predominando condiciones prooxidantes⁶⁵⁻⁶⁸.

Cuando el desbalance es ligero se producirá modificación oxidativa de grupos sulfhidrilo de residuos de cisteínas (S-glutacionilación o formación de puentes disulfuro intramoleculares) en proteínas sensibles al estado redox, lo cual afectará la función de estas biomoléculas. Generalmente son factores de transcripción por lo que se alteran determinadas vías de señalización celular y la expresión genética⁶⁶. Cuando es severo ocasiona daño oxidativo a biomoléculas (lípidos, proteínas y ADN) y por consiguiente alteración de las funciones celulares que puede conducir a la muerte celular⁶⁵⁻⁶⁸.

1.2.1 Especies reactivas del oxígeno

Las ERO son moléculas que contienen oxígeno, son muy reactivas y tienen una vida media muy corta. Existen especies radicálicas y no radicálicas. Los radicales libres son aquellos que contienen un electrón desapareado en su orbital externo. Dentro de las ERO de mayor interés biológico se encuentran: anión superóxido,

peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo, oxígeno singulete, óxido nítrico, anión peroxinitrito, ácido hipocloroso y los radicales orgánicos^{65,67,68} (Anexo 2).

Las ERO son subproductos del metabolismo celular. Las ERO cumplen importantes funciones. A concentraciones moderadas las ERO actúan como moléculas señalizadoras y juegan un importante papel en la regulación del tono vascular, el crecimiento y la proliferación celulares, la apoptosis y la respuesta inflamatoria^{65,67}.

La principal fuente de generación de ERO son las mitocondrias. Bajo condiciones normales aproximadamente el 2 % del oxígeno molecular consumido, experimenta reducción univalente, convirtiéndose en anión superóxido a nivel de los complejos I y III de la cadena transportadora de electrones^{65,67,68}.

Las ERO también son generadas a partir de fuentes no mitocondriales como durante la degradación de purinas y la degradación en los peroxisomas de los ácidos grasos de cadena muy larga y los de cadena ramificada. Otras fuentes no menos importantes son: producto de la actividad de las enzimas nicotin adenin dinucleótido fosfatado reducido (NADPH) oxidasa y monoaminoxidasa, en las reacciones de hidroxilación catalizadas por el sistema microsomal del citocromo P450, así como producto del metabolismo de los icosanoides mediado por la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa^{65,68}.

1.2.2 Antioxidantes

El organismo utiliza potentes mecanismos para evitar la acumulación de ERO. Los mismos son llevados a cabo por sustancias que a bajas concentraciones con relación a un sustrato oxidable disminuyen o previenen su oxidación. Estos compuestos se denominan genéricamente antioxidantes y pueden clasificarse

atendiendo a diferentes criterios. Según su naturaleza química existen dos grupos de antioxidantes: enzimáticos y no enzimáticos^{65,68}.

Dentro de los antioxidantes enzimáticos se encuentran las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR), paraoxonasa (PON), peroxirredoxina (PRX) y tiorredoxina reductasa (Anexo 3). Estas enzimas pueden actuar concertadamente o de forma independiente^{65,68}.

La SOD es una metaloenzima que cataliza la dismutación del radical superóxido dando oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno. Es la única enzima conocida que actúa sobre un radical. La CAT reacciona con el peróxido de hidrógeno, producido en la reacción catalizada por SOD, generando agua y oxígeno molecular. La GPx cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno o lipoperóxidos utilizando como agente reductor al glutatión reducido (GSH), el cual es regenerado por acción de la GR. La GPx presenta mayor afinidad que CAT por su sustrato^{65,68}.

Las PON además de poder hidrolizar compuestos organofosforados tienen discreta actividad de esterasa y lactonasa. Estas enzimas circulan en el plasma asociadas generalmente con las HDL y son capaces de hidrolizar los fosfolípidos oxidados presentes en las LDL⁶⁹. Las PRX se encuentran en altas concentraciones (50–100 mM) dentro de la célula y reaccionan muy rápidamente con el peróxido de hidrógeno convirtiéndolo en agua y oxígeno molecular, a expensas de la oxidación de la tiorredoxina [Trx (S-S)]. La tiorredoxina reducida [Trx (SH)₂] es regenerada por acción de la enzima tiorredoxina reductasa⁶⁵.

El sistema antioxidante no enzimático está constituido por proteínas como la transferrina, ferritina, ceruloplasmina, tiorredoxina y la albúmina, las que secuestran metales de transición (hierro y cobre). Otro grupo de compuestos de bajo peso

molecular se incluyen dentro de los antioxidantes no enzimáticos tales como: GSH, ácido úrico, bilirrubina, coenzima Q (CoQ), las vitaminas C y E y los β -carotenos^{65,68} (Anexo 3).

El GSH es un tripéptido (gamma-glutamil-cisteinil-glicina) y constituye el principal antioxidante endógeno no enzimático del organismo. Interviene en la detoxificación de compuestos electrofílicos, captura de radicales libres y modula funciones inmunes. Al igual que la tioredoxina preserva los grupos sulfhidrilos en las proteínas previniendo su oxidación. El ácido úrico secuestra los iones divalentes del hierro o del cobre, reacciona con el ácido hipocloroso y elimina directamente los radicales peroxilo, alcoxilo e hidroxilo^{65,68}.

La CoQ y la vitamina E son moléculas liposolubles que actúan deteniendo la cadena de propagación de reacciones de peroxidación lipídica. La primera participa en la regeneración de la vitamina E en condiciones de estrés oxidativo. Los β -carotenos también son lipofílicos, inactivan al singulete del oxígeno y capturan radicales libres, especialmente los lipoperóxidos. En contraste, la vitamina C es hidrosoluble y puede reaccionar con los radicales superóxido e hidroxilo. Además cumple una importante función en la regeneración de la vitamina E^{65,68}.

1.2.3 Daño a biomoléculas por especies reactivas del oxígeno

Las ERO reaccionan con biomoléculas (lípidos, glúcidos, proteínas y ADN) modificando su estructura y alterando su función. Frente a la lesión oxidativa la célula puede repararla, sobrevivir con persistencia del daño u organizar su muerte^{65,68}.

Los lípidos que contienen en su estructura ácidos grasos poliinsaturados sufren peroxidación en presencia de ERO y oxígeno molecular. Se produce una cadena de reacciones de oxidación donde varias moléculas lipídicas son oxidadas. En la fase de iniciación un radical de elevada reactividad como el hidroxilo extrae un átomo de hidrógeno de un ácido graso insaturado produciendo un radical lipídico centrado en el carbono (L[•]). Este radical experimenta una reorganización molecular formándose un radical más estable: el dieno conjugado, el cual en su reacción con el oxígeno da lugar al radical peroxilo (LOO[•]). Este último posee suficiente reactividad como para atacar a otro lípido y conducir la propagación de la peroxidación lipídica^{65,68} (Anexo 2).

Durante las reacciones de peroxidación lipídica se producen aldehídos como el malonildialdehído (MDA) y el 4-hidroxi-trans-2-nonenal (HNE) y otros compuestos (isoprostanos, hidrocarburos de cadena corta) que son utilizados como marcadores del daño oxidativo a lípidos^{65,68} (Anexo 2). Algunos de estos productos de la peroxidación lipídica inducen daño a proteínas y al ADN⁷⁰.

Las proteínas son atacadas con frecuencia por el radical hidroxilo y por el peroxinitrito. Todos los aminoácidos son sensibles al ataque de las ERO, no obstante los productos de oxidación más estables que se han detectado son aquellos relacionados con residuos de triptófano, metionina, tirosina, fenilalanina y cisteína^{65,71}.

Dentro de las modificaciones oxidativas de las proteínas se pueden citar la formación de derivados de tirosina como nitrotirosina, clorotirosina o ditirosina. Se pueden formar puentes disulfuros intramoleculares o intermoleculares, formación de proteína-ácido sulfénico, glutationilación y nitración de residuos de cisteína

(Anexo 4). Otros daños son la formación de grupos carbonilos a partir de la oxidación de lisina, arginina, histidina y prolina, así como los entrecruzamientos entre cadenas polipeptídicas, proteínas-ADN y la fragmentación de proteínas^{65,71}.

Los productos avanzados de oxidación de proteínas (PAOP) que se forman por la acción de oxidantes clorados, especialmente el ácido hipocloroso y las cloraminas producidas por mieloperoxidasas en neutrófilos activados, así como los grupos carbonilos son compuestos estables utilizados con frecuencia como marcadores de daño oxidativo a proteínas. Las consecuencias de las modificaciones oxidativas son la alteración o pérdida de la función de la proteína, la agregación de las proteínas oxidadas, incremento de la inmunogenicidad y modificación de la expresión genética^{65,71}.

El ADN es dañado fundamentalmente por el radical hidroxilo y los productos radicálicos de la peroxidación lipídica, entre otros. Entre las lesiones provocadas por las ERO al ADN están la modificación química de las bases nitrogenadas, la oxidación de la 2-desoxirribosa, formación de sitios apurínicos o apirimidínicos por pérdida de bases nitrogenadas, entrecruzamientos y roturas monocatenarias o bicatenarias. La guanina es la base más sensible al ataque oxidativo⁷², el compuesto que se origina es estable, razón por la cual el nucleósido 8 hidroxidesoxiguanosina es el marcador más utilizado al evaluar el daño oxidativo al ADN (Anexo 5). Estas lesiones son mutagénicas y pudieran modificar la expresión de algunos genes⁶⁵.

La integridad del ADN mitocondrial es necesaria para el adecuado funcionamiento de la cadena transportadora de electrones y la producción de ATP que ocurre en la mitocondria. El ADN mitocondrial codifica varias subunidades de los complejos de

la cadena de transporte electrónico mitocondrial. El ADN mitocondrial es más susceptible al daño oxidativo que el ADN nuclear, ya que carece de la protección ofrecida por las histonas y las regiones no codificantes son escasas o no existen por lo que esto favorece la mutagénesis inducida por oxidación⁷³.

1.2.4 Estrés oxidativo inducido por la obesidad

La ingesta excesiva de macronutrientes favorece las oxidaciones biológicas (de glucosa y ácidos grasos), y por consiguiente un incremento en la actividad mitocondrial. Cuando el suministro excesivo y continuado de ácidos grasos que van a oxidarse supera la capacidad funcional de la mitocondria, estos y sus derivados se acumulan provocando disfunción mitocondrial e incremento en la producción de ERO mediante diferentes mecanismos^{54,59}.

Los AGNE de cadena larga actúan como desacopladores de la respiración celular. Estos disipan el gradiente de protones generado durante el transporte de electrones. Las moléculas de AGNE de cadena larga en su forma no disociada experimentan espontáneamente movimientos transversales (Flip-Flop) desde la monocapa externa hacia la interna de la membrana mitocondrial interna (MMI). Una vez aquí liberan un protón hacia la matriz mitocondrial debido a su mayor valor de pH con respecto al espacio intermembranoso^{54,74}.

Los AGNE en su forma aniónica son transportados hacia el espacio intermembranoso a través del transportador ADP/ATP o de otros transportadores de la MMI o de proteínas desacopladoras. Una vez allí captan un protón del medio, pasando a su forma no disociada. De esta forma se produce el paso neto de un protón desde el espacio intermembranoso hacia la matriz mitocondrial por molécula de AGNE de cadena larga^{54,74}.

Los AGNE, en su forma aniónica, son inhibidores competitivos de los transportadores ADP/ATP y del aspartato/glutamato. Esta inhibición altera la concentración intra y extra mitocondrial de ATP y la función mitocondrial^{54,74,75}.

Los AGNE de cadena larga, preferentemente los poliinsaturados, y sus derivados estimulan la producción mitocondrial de ERO al interactuar con componentes de los complejos I y III de la cadena respiratoria e inactivarlos. También causan la liberación del citocromo c hacia el citosol con lo cual se bloquea el transporte de electrones y la reducción del oxígeno molecular a agua. Todo esto potencia la producción de anión superóxido a nivel de los complejos I y III^{3,5-7,54,74,75} (Anexo 6).

La fluidez de la MMI se incrementa por la incorporación de los AGNE de cadena larga, mediante la apertura de poros. Esto facilita la denominada “fuga de electrones”, con lo cual se produce la reducción univalente del oxígeno a anión superóxido^{54,74}.

La generación de ERO a partir de fuentes no mitocondriales también es estimulada por los AGNE, específicamente por los poliinsaturados de cadena larga (Anexo 7). El sistema de la NADPH oxidasa de membrana plasmática es activado por los AGNE en células fagocíticas, endoteliales, fibroblastos, adipocitos, linfocitos T y B^{3,6,74}. Los propios AGNE constituyen sustratos para la oxidación, incrementándose los productos de la peroxidación lipídica, altamente reactivos que inducen daño a biomoléculas. Se plantea que los AGNE pudieran inactivar la regeneración de GSH, por consiguiente disminuye la eliminación de peróxido de hidrógeno, hidroperóxidos y lipoperóxidos por acción de la glutatión peroxidasa⁷⁴.

Las citocinas proinflamatorias contribuyen a intensificar el estrés oxidativo pues activan al complejo NADPH oxidasa, que constituye una de las fuentes de ERO, al tiempo que inhiben la expresión de enzimas antioxidantes^{6,7}.

Como consecuencia de la resistencia a la insulina, se elevan los niveles de glucosa en sangre. En condiciones de hiperglicemia se incrementa la producción de radical superóxido debido a la activación de cinco vías⁷⁶: (1) Glicosilación no enzimática de proteínas, mediante la cual se obtienen los llamados productos finales de glicosilación avanzada (AGE, por sus siglas en inglés: advanced glycosilation end products); (2) Incremento en la velocidad de la vía del poliol (controlada por la enzima aldosa reductasa) con la consiguiente disminución de NADPH, el cofactor de la enzima antioxidante glutatión reductasa y otros intermediarios. (3) Incremento de la vía de la hexosamina, en la cual se forma N-acetil glucosamina. (4) Incremento de la expresión del receptor AGE y sus ligandos y (5) activación de isoformas de la PKC.

La hiperleptinemia estimula a la PKC, la cual fosforila a la subunidad p47^{phox} del complejo multienzimático de la NADPH oxidasa en células endoteliales y musculares lisas de los vasos sanguíneos. La fosforilación activa al complejo, el cual genera anión superóxido⁶.

El aumento de las concentraciones de leptina produce disminución de la actividad de PON-1, reduciendo la capacidad antioxidante. Esta enzima previene la acumulación de peróxidos lipídicos en las LDL^{3,6}. La leptina además activa la proliferación de monocitos y macrófagos, la síntesis y liberación de citocinas proinflamatorias^{6,7}.

La actividad del sistema renina-angiotensina está incrementada en la obesidad. La angiotensina II al interactuar con su receptor estimula la generación de ERO mediada por la NADPH oxidasa en células vasculares y adipocitos^{3,6}.

El desacoplamiento de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) es otro mecanismo que pudiera contribuir a la producción de ERO en la obesidad. A baja concentración de su sustrato (L-arginina) o de su cofactor (tetrahidrobiopterina) la enzima óxido nítrico sintasa genera preferentemente radical superóxido en vez de óxido nítrico⁶. Esto se ha descrito en células endoteliales y observado en modelos animales de enfermedad cardiovascular y pacientes con riesgo cardiovascular. En el tejido adiposo hay elevada expresión de eNOS e iNOS, pero la contribución de este mecanismo a la generación de ERO en las células grasas no está bien esclarecida⁶.

Por otro lado, existen evidencias que demuestran que los obesos exhiben una inadecuada defensa antioxidante. El consumo de fitoquímicos y antioxidantes en la dieta es generalmente bajo en los obesos. Los niveles séricos de vitaminas E y C, β -carotenos y minerales como el zinc y el selenio (cofactores de enzimas antioxidantes) se han encontrado disminuidos en personas obesas con respecto a individuos no obesos. La reducción de la actividad de las principales enzimas antioxidantes, así como de la capacidad antioxidante total se ha constatado en los obesos. Todo ello favorece el estrés oxidativo^{3,4,6,7}.

Las propias ERO son capaces de reforzar la situación de estrés oxidativo pues a nivel mitocondrial inducen la apertura de poros de transición de la permeabilidad lo que permite la "fuga de electrones". Ello favorece la reducción del oxígeno a anión superóxido⁷⁷. Son capaces de activar a seril/treonil proteínas kinasas e inducir

resistencia a la insulina^{3,6,7}. Las ERO aumentan la expresión de citocinas inflamatorias mediado por la activación del factor nuclear- kappa B (NF-κB) y disminuyen la síntesis de adiponectina^{3,6,7}. Un resumen de los mecanismos que conducen a estrés oxidativo en la obesidad aparece en el Anexo 8.

1.3 Adaptaciones metabólicas durante la gestación normal y en la obesidad

Durante la gestación, el metabolismo de la madre sufre adaptaciones para asegurar el continuo aporte de nutrientes a la unidad feto-placentaria y así poder soportar su crecimiento, lograr una adecuada homeostasis metabólica de la madre y su preparación para la lactancia. Las adaptaciones metabólicas se incrementan con el avance de la gestación y desaparecen después del parto⁷⁸.

La gestación se caracteriza por dos etapas claramente diferenciadas. En los dos primeros tercios del embarazo (fase anabólica) el crecimiento del producto es lento. En la madre se favorece el almacenamiento de energía en forma de TAG (lipogénesis) con lo que se incrementa la masa grasa⁷⁸.

En el último tercio (fase catabólica) el crecimiento fetal es muy rápido y los lípidos almacenados son movilizados (hiperlipemia) para ser usados por los tejidos maternos periféricos y para la lactancia. Lo anterior minimiza el catabolismo proteico y preserva la glucosa para el embrión y el feto. Se estimula la lipólisis, incrementándose los niveles plasmáticos de AGNE y glicerol. Este último constituye sustrato de la gluconeogénesis. El aumento de las concentraciones plasmáticas de cortisol a lo largo de la gestación estimula ese proceso metabólico^{78,79}.

En el hígado, los AGNE son incorporados a la síntesis de triacilgliceroles y retornan a la circulación en forma de VLDL, lipoproteína que aumenta su concentración en el plasma materno. Por acción de la lipasa de lipoproteína se liberan ácidos grasos que pueden atravesar la membrana placentaria y servir como fuente de energía al embrión o feto^{78,79}. Los AGNE a nivel hepático también son beta-oxidados formándose acetilcoenzima A. Esto favorece la síntesis de cuerpos cetónicos a partir de acetilcoenzima A, condicionando la cetosis en la embarazada. Los cuerpos cetónicos pueden atravesar la placenta y servir de fuente de energía al embrión o feto o pueden ser utilizados por los tejidos maternos^{78,79}.

El embrión y el feto utilizan preferentemente la glucosa como combustible. Se incrementan los niveles plasmáticos de insulina con el avance de la gestación como consecuencia del establecimiento de un leve estado de resistencia a la hormona en la madre, lo que permite la difusión de la glucosa plasmática a través de la placenta hacia el producto de la concepción. Además, se incrementa la producción hepática de glucosa. Conjuntamente disminuyen los niveles plasmáticos de adiponectina a lo largo del embarazo contribuyendo al estado de resistencia a la insulina⁷⁸.

En la gestación las concentraciones plasmáticas de leptina se incrementan y disminuyen la de su receptor instaurándose un estado de resistencia a esta hormona. Ello favorece el incremento del apetito y la acumulación de reservas grasas en la madre. La resistencia a la leptina es inducida por hormonas como la progesterona, el lactógeno placentario y la prolactina⁷⁸.

El embarazo es un estado normal en la mujer adulta en el que se produce una demanda energética elevada. También ocurre incremento del consumo basal de

oxígeno a lo largo de la gestación, exceptuando la hipoxia fisiológica del primer trimestre. Todo ello favorece la producción de ERO, sobretodo de productos de la peroxidación lipídica⁸⁰. La hipoxia del primer trimestre favorece la implantación del embrión y la diferenciación celular y lo protege del efecto deletéreo de las ERO durante la organogénesis⁸¹.

Conjuntamente con la producción incrementada de ERO durante la gestación, se potencian los mecanismos de defensa antioxidante. Aumentan fundamentalmente los niveles de antioxidantes no enzimáticos como vitaminas E y C, ceruloplasmina, glutatión y ácido úrico en la circulación materna⁸⁰.

La placenta humana es hemocorial, rica en mitocondrias, contiene abundantes macrófagos, está altamente vascularizada y expuesta a elevada presión parcial de oxígeno materna. Estas características explican en parte, la producción de radicales libres a nivel placentario, especialmente peróxidos lipídicos. El óxido nítrico también es producido localmente. En el embarazo normal, las eficientes defensas placentarias antioxidantes son suficientes para controlar la peroxidación lipídica, sin embargo este equilibrio se puede alterar fácilmente⁴¹.

La obesidad materna exagera los ajustes metabólicos que ocurren usualmente en el embarazo. Las mujeres obesas experimentan desde el inicio de la gestación estado severo de resistencia a la insulina y a la leptina, estrés oxidativo, inflamación crónica e hiperlipemia (hipertriacilglicerolemia, aumento de AGNE) exagerada^{12,78}. El tejido adiposo es la fuente primaria de estrógenos por lo que los niveles plasmáticos de estrógenos se incrementan con la adipocidad. Esto genera un aumento aún más marcado de las concentraciones séricas de los lípidos⁷⁹. Todo esto trae consecuencias negativas sobre la madre y su descendencia^{12,78}.

La resistencia a la insulina en el embarazo complicado con obesidad incrementa el riesgo de diabetes gestacional y macrosomía fetal. A esta última también contribuye la hiperlipemia. El aumento de los niveles de glucosa sanguínea como consecuencia de la resistencia a la insulina así como el flujo incrementado de AGNE hacia el embrión induce estrés oxidativo y causa malformaciones congénitas. El ambiente prooxidante acrecienta la probabilidad de hipertensión gestacional, rotura prematura de membranas, parto pretérmino y crecimiento intrauterino retardado^{4,12,82}. El feto expuesto a hiperleptinemia desarrolla resistencia a la leptina que se mantiene posnatalmente. Lo anterior conduce a hiperfagia y a obesidad en etapas tempranas de la vida¹³.

1.3.1 Estrés oxidativo y anomalías congénitas

Las ERO alteran el desarrollo embrionario y como consecuencia aparecen malformaciones congénitas en la descendencia. El embrión es particularmente vulnerable al estrés oxidativo. La expresión de transportadores de glucosa en el embrión o feto y la placenta es elevada. Como consecuencia de ello, las concentraciones intracelulares de glucosa en el embrión estarán en equilibrio con las concentraciones séricas maternas^{81,83}. Además, la concentración de AGNE en el embrión, especialmente la de los poliinsaturados de cadena larga es dependiente de los niveles maternos de estos. Estos sustratos energéticos estimulan la producción de ERO en el embrión¹³.

El embrión se desarrolla en un ambiente relativamente hipóxico. Por lo tanto, sólo un pequeño porcentaje de la glucosa es oxidada y sólo se genera una pequeña proporción de radical superóxido. La expresión disminuida de enzimas antioxidantes en el embrión es característica. Un ligero incremento en la producción

de anión superóxido y otras ERO podría ejercer efectos deletéreos sobre el embrión^{81,83}.

Las ERO causan dismorfogénesis por dos mecanismos fundamentales: 1) mediante el daño directo al ADN, lo cual ejerce un efecto mutagénico que afecta la expresión génica; y 2) actúan sobre factores de transcripción que regulan vías de señalización celular involucradas en procesos celulares, como la proliferación, la diferenciación y la apoptosis. De esta forma, las ERO alteran la expresión de genes durante la organogénesis⁸³.

Uno de los genes más estudiados relacionados con el desarrollo del embrión es PAX 3, cuyo producto génico es el factor de transcripción Pax3. Este se expresa a nivel del tubo neural, de las crestas neurales y del mesodermo somático. Se ha demostrado que Pax 3 inhibe la apoptosis dependiente de p53 a nivel del tubo neural y de las crestas neurales, estimulando la ubiquitinación y posterior degradación de p53. Con ello se garantiza el cierre del tubo neural⁸⁴.

Por otra parte, Pax 3 inhibe la muerte celular dependiente de p53 de las células cardíacas de las crestas neurales e induce la migración de estas hacia la región troncoconal. Estas células intervienen en la remodelación y tabicamiento del tronco común dando origen a las arterias aorta y pulmonar. Las células cardíacas de las crestas neurales garantizan el posicionamiento correcto de estos grandes vasos y también participan en el tabicamiento del corazón⁸⁵.

Las ERO inhiben la expresión de PAX 3, a la par de que activan a p53. Ha sido demostrado que las ERO activan a la proteína kinasa dependiente de AMP (AMPK). La activación de AMPK provoca disminución de la expresión de PAX 3. Este efecto es prevenido con antioxidantes como la vitamina E y el glutatión⁸⁶. El estrés

oxidativo también activa a la ADN metiltransferasa 3b, enzima que metila y silencia a PAX 3⁸⁷.

Como consecuencia de la inhibición de PAX 3 se producen defectos del cierre del tubo neural y malformaciones cardíacas, los cuales son frecuentes en los hijos de madres obesas¹⁵⁻¹⁸. Morgan y colaboradores⁸⁵ probaron que las ERO inhiben la migración de las células cardíacas de las crestas neurales y que este efecto es bloqueado con antioxidantes.

El estrés oxidativo media la activación de seril/treonil proteínas kinasas tales como PKC β 2 y JNK1/2 las cuales inducen apoptosis. La participación de estas enzimas en la patogénesis de los defectos del cierre del tubo neural ha sido demostrada^{44,88}.

1.4 Modelos animales de obesidad

Los modelos animales en la obesidad nos permiten identificar los factores genéticos, metabólicos, epigenéticos y ambientales relacionados con esta condición, así como desarrollar nuevas estrategias terapéuticas. Además, los modelos animales de obesidad nos ayudan a comprender las bases genéticas y fisiológicas de la homeostasis energética, de la percepción del gusto y el olfato y de la conducta de selección del alimento⁸⁹.

Debido a la gran similitud y homología entre el genoma de roedores y humanos, estos modelos animales son un medio fundamental para el estudio de condiciones morbosas que afectan a los humanos⁴⁵. Se requiere de un número bajo de animales en las investigaciones y el mantenimiento de los mismos es relativamente fácil. Su multiparidad, gestación de corto período de duración y la placentación hemocorial como la humana, así como mecanismos similares de intercambio de nutrientes, son

características que favorecen el uso experimental de los roedores⁹⁰. La obesidad en estos animales puede ser inducida mediante manipulación genética, dietética o por lesión hipotalámica⁴⁵.

Los modelos genéticos mono o poligénicos han sido obtenidos espontáneamente o de forma artificial, por exposición de los animales a radiaciones o mutágenos químicos. En este caso se requieren de estudios previos de mutagénesis y la identificación de la mutación que pudieran asociarse a tal condición en los animales. Además existen los modelos producidos por ingeniería genética, llamados transgénicos⁸⁹. En general las modificaciones genéticas pueden alterar o suprimir la secreción de neuropéptidos, hormonas relacionadas con la saciedad o el metabolismo^{45,89}. Los modelos genéticos de preñez deben acompañarse de técnicas de transferencia de embriones para analizar los efectos maternos independientes del genotipo fetal⁹¹.

Mediante la administración de dietas hipercalóricas ricas en carbohidratos o en grasas o una combinación de ambos nutrientes se puede inducir obesidad en animales de laboratorio como las ratas^{45,89}. La cantidad de calorías en la mayoría de los modelos varía de 3,7 Kcal/g de peso corporal a 5,4 Kcal/g de peso corporal⁴⁵. Son los modelos más ampliamente usados por su similitud al origen de la obesidad humana^{45,89}.

La obesidad generada a consecuencia de lesión hipotalámica puede ser provocada con la aplicación de corriente eléctrica o por la administración de GMS⁴⁵.

1.4.1 Obesidad inducida por glutamato monosódico

El GMS es la sal sódica del ácido glutámico y es utilizado como condimento para potenciar el sabor de algunos alimentos tales como: sopas, salsas y pizzas⁹² (Anexo 9). En roedores la administración de GMS por vía parenteral, durante el período neonatal, produce la muerte neuronal a nivel del núcleo arqueado hipotalámico. La lesión cerebral conduce a desregulación del eje hipotálamo-pituitario y pérdida del control de la homeostasis energética^{45,92}.

El modelo de obesidad inducida por GMS fue descrito por primera vez por Olney en 1969⁹³. A pesar de que no es el modelo que más se asemeja al origen de la obesidad humana, los animales desarrollan en la adultez un síndrome endocrino-metabólico caracterizado por obesidad visceral, resistencia a la insulina y a la leptina, intolerancia a la glucosa, e incremento plasmático de glucocorticoides. Se requieren entre 4 y 10 dosis de GMS para inducir obesidad. La cantidad de producto a administrar en cada dosis varía entre 2-4mg/Kg de peso corporal⁴⁵.

Las alteraciones en el perfil lipídico sérico están presentes en estos animales y se distinguen por aumento de las VLDL y triacilgliceroles plasmáticos, generalmente aumento del colesterol total y de las LDL-colesterol con disminución de las HDL-colesterol⁹⁴⁻⁹⁹. También se ha constatado incremento de los AGNE en la circulación^{97,98,100,101}. La acumulación ectópica de lípidos, especialmente la esteatosis hepática se ha observado en roedores obesos con GMS por lo que el modelo ha sido empleado para estudiar la enfermedad de hígado graso no alcohólica^{95,98,100,101}. Las alteraciones mencionadas también son típicas de la obesidad en humanos⁴ y hacen a este modelo de gran utilidad para reproducir complicaciones de la obesidad pregestacional. Otras manifestaciones mostradas son hipofagia, hipoactividad y función reproductiva alterada⁴⁵.

Los mecanismos por los cuales el GMS ejerce su acción sobre el sistema nervioso central no están aún bien esclarecidos. Se plantea que el GMS provoca activación persistente de receptores ionotrópicos como los del N-metil-D-aspartato (NMDAR) que forman un canal para el calcio y metabotrópicos grupo I (excitotoxicidad). Estos últimos están acoplados a una proteína G que activa a la fosfolipasa C, enzima que tiene como sustrato al fosfatidil 4,5 inositol bisfosfato y genera dos segundos mensajeros: inositol trisfosfato (IP₃) y DAG. El IP₃ produce la apertura de un canal de calcio en el RE. La estimulación de dichos receptores provoca sobrecarga de calcio en el citosol¹⁰².

El calcio intracelular se une a la calmodulina, proteína que interactúa y activa a varias enzimas como fosfolipasas, PKC, proteasas y NOS. Debido a esto se incrementa la producción de radicales libres, se activan vías de señalización que conducen a apoptosis y ocurre fallo energético¹⁰². Se ha encontrado disminución de neurotransmisores como dopamina, serotonina y noradrenalina⁴⁵. Se plantea que la enzima alanino aminotransferasa (ALAT) es capaz de degradar bajo condiciones fisiológicas, concentraciones neurotóxicas de glutamato con lo cual evitaría el desarrollo de excitotoxicidad en algunos tejidos, que como el hígado expresan receptores NMDA¹⁰³.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

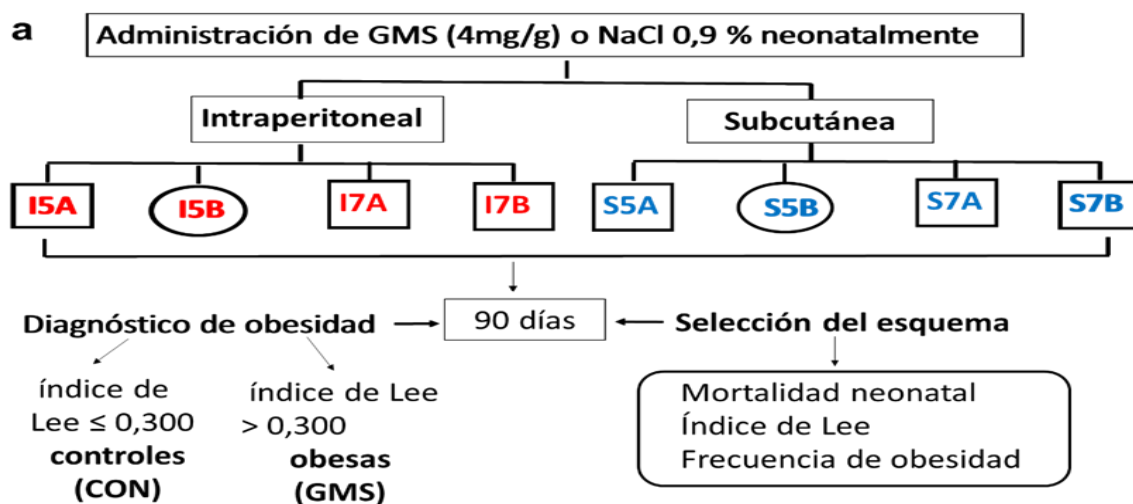
2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Tipo de investigación: longitudinal, prospectiva, explicativa, con diseño experimental.

2.2 Consideraciones éticas: el proyecto fue aprobado por el Consejo Científico y el Comité de Ética del Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón". La investigación constituyó parte de un proyecto ramal del Ministerio de Salud Pública, aprobado por el Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente (No. 0801132).

El trabajo con los animales tuvo en cuenta las regulaciones o pautas establecidas para el cuidado y uso de los mismos¹⁰⁴. La manipulación de estos se llevó a cabo por personal adecuadamente entrenado. Se utilizaron el menor número de animales posible para este tipo de estudio. Los procedimientos empleados así como los métodos de eutanasia aplicados garantizaron el dolor y sufrimiento mínimos para las ratas^{104,105}.

2.3 Diseño general del estudio: en la figura 11 se muestran los pasos generales del diseño experimental.



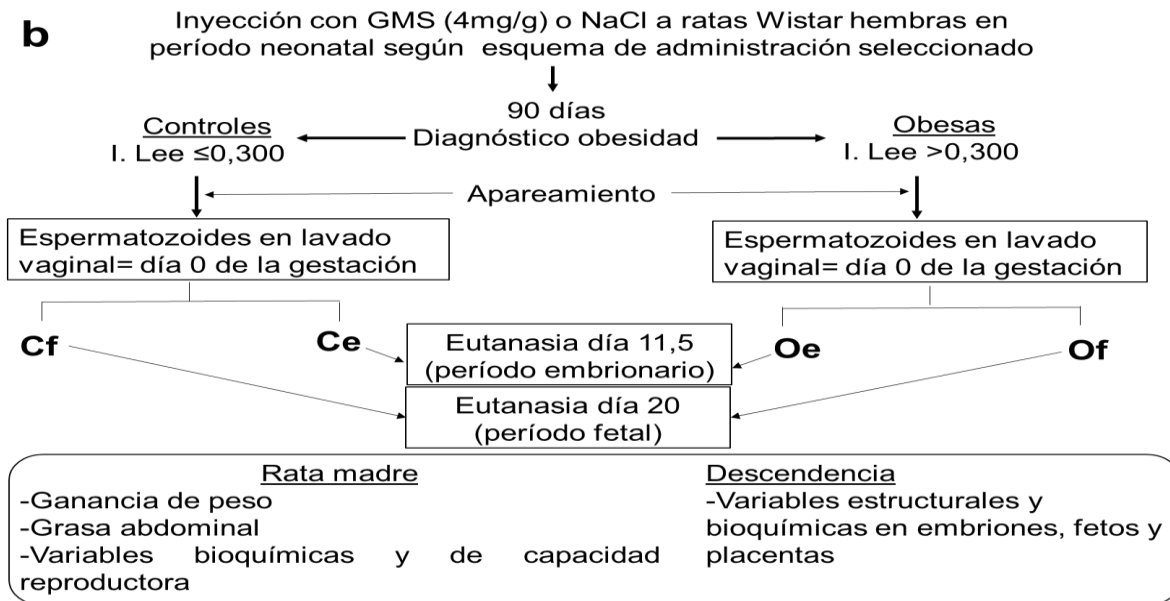


Figura 11. Diseño general del estudio. Se muestran los pasos generales del diseño experimental. a: Tarea de investigación 1. I: intraperitoneal, S: subcutáneo, 5: 5 dosis, 7: 7 dosis, A: inicio de administración día 1 de vida, B: inicio de administración día 2 de vida, Rectángulo: administración diaria, Círculo: administración en días alternos. b: Tareas de investigación 2 y 3. Ce: ratas controles con 11,5 días de gestación; Oe: ratas obesas con 11,5 días de gestación; Cf: ratas controles con 20 días de gestación; Of: ratas obesas con 20 días de gestación.

2.4 Descripción de las tareas de investigación

2.4.1 Tarea de Investigación 1. Selección del esquema de administración para inducir obesidad por el glutamato monosódico en ratas Wistar

A) Inducción de obesidad: se emplearon ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) gestadas, procedentes del Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio de Cuba (CENPALAB). El día en que se produjo el nacimiento de las crías fueron separadas por sexo. Los machos fueron eliminados del estudio y utilizados en investigaciones de otros departamentos. Se consideró el día del nacimiento como día cero. Atendiendo al número y frecuencia de las dosis, al día de comienzo y la vía de administración (parenteral) se evaluaron 8 esquemas de administración para inducir obesidad con

GMS en período neonatal (Tabla 1). La mayoría de estos esquemas han sido usados por otros autores para provocar obesidad en roedores^{94,96,99,106-108}.

Con cada esquema de administración se trabajó con dos grupos experimentales: ratas tratadas con GMS (Sigma-Aldrich) y ratas a las que se le administró NaCl 0,9 % (grupo control, CON). En cada grupo experimental se utilizaron de 8 a 13 animales. La cantidad de GMS inyectado en cada dosis fue de 4 mg/g de peso corporal, disuelto en NaCl 0,9 % (dosis única/día). A los controles se le administró un volumen equivalente del vehículo. La dosis de GMS usada es la máxima establecida para inducir obesidad en ratas y la que con más frecuencia se utiliza^{45,94,96,99,106-108}.

El primer ensayo se realizó utilizando la vía intraperitoneal. Esta vía es muy usada por la extensa área de la cavidad abdominal y por su abundante irrigación sanguínea que facilita una rápida absorción¹⁰⁹. Se probaron cuatro esquemas de administración mediante esta vía (I5A, I5B, I7A, I7B,) y posteriormente cuatro esquemas de administración por la vía subcutánea (S5A, S5B, S7A, S7B) (Tabla 1). Luego de concluida la administración de GMS o el vehículo los animales fueron destetados a los 21 días y mantenidos bajo las condiciones descritas en el acápite 2.5 hasta el día 90 de vida.

B) Diagnóstico de obesidad: a las 8:00 am del día 90 de vida a los animales se les determinó el peso corporal (g) y la longitud corporal (LC, cm) para el cálculo del índice de Lee⁴⁶. Con valores iguales o menores a 0,300 las ratas se consideraron como no obesas, mientras si el índice de Lee > 0,300 como obesas⁴⁶.

Tabla 1. Esquemas de administración del glutamato monosódico o NaCl 0,9 % evaluados

Vía de administración	Denominación	Número de dosis	Día de comienzo	Frecuencia de las dosis	Número de Animales CON/GMS
INTRAPERITONEAL (I)	I5A	5 dosis	Día 1	Diario (día 1 hasta día 5)	10/12
	I5B	5 dosis	Día 2	Días alternos (días 2, 4, 6, 8 y 10)	10/12
	I7A	7 dosis	Día 1	Diario (día 1 hasta día 7)	10/13
	I7B	7 dosis	Día 2	Diario (día 2 hasta día 8 de vida)	10/13
SUBCUTÁNEA (S)	S5A	5 dosis	Día 1	Diario (día 1 hasta día 5)	8/8
	S5B	5 dosis	Día 2	Días alternos (días 2, 4, 6, 8 y 10)	8/8
	S7A	7 dosis	Día 1	Diario (día 1 hasta día 7)	8/8
	S7B	7 dosis	Día 2	Diario (día 2 hasta día 8)	8/8

CON: inyectadas con NaCl 0,9% (controles). GMS: inyectadas con glutamato monosódico.

C) Selección del esquema de administración: para la selección del esquema de administración del GMS para inducir obesidad, se tuvo en cuenta la mortalidad neonatal, el índice de Lee y la frecuencia de obesidad con cada esquema de administración. Después de la selección del esquema de administración para inducir obesidad, las ratas que no se incluyeron en los grupos experimentales (tareas de investigación 2 y 3) fueron utilizadas para otros fines relacionados con la docencia y la investigación en nuestro centro.

2.4.2 Tareas de investigación 2 y 3. Evaluación de la influencia de la obesidad pregestacional inducida por glutamato monosódico en ratas sobre el desarrollo embrionario, fetal y placentario

Por su factibilidad se realizó primero el estudio de la etapa embrionaria (Tarea 2) del desarrollo y luego de la fetal (Tarea 3).

A) Procedimiento desde el nacimiento hasta el destete

A1) Inducción de obesidad: se siguió el mismo procedimiento que el descrito en el acápite 2.4.1A, pero aplicando el esquema de administración seleccionado en la tarea de investigación 1. Luego de concluida la administración del GMS o vehículo las crías se mantuvieron junto a sus madres hasta el día 21 de vida.

B) Procedimiento a partir del destete y hasta los 90 días de vida: al igual como refiere la literatura¹⁰⁹ los animales fueron destetados a los 21 días y colocados en cajas colectivas (4-5 ratas por caja) hasta los 90 días. El día del destete se determinó el peso de todos los animales. A partir de este momento se evaluó semanalmente la ganancia de peso hasta los 90 días de vida. En igual período, la ingesta alimenticia fue estimada por medición de la cantidad de alimento consumido en 24 horas. Para ello los animales fueron colocados una vez por semana en jaulas metabólicas entre 7:30 am y 8:00 am. Pasadas 5 horas de adaptación se iniciaba la medición del alimento durante 24 horas¹⁰⁹. A los 90 días se les realizó el diagnóstico de obesidad y se determinaron variables nutricionales.

C) Diagnóstico de obesidad: se realizó de la forma descrita en la tarea de investigación 1. Las ratas inyectadas con NaCl 0,9 % (controles) en período neonatal con valores de índice de Lee superiores a 0,300 a los 90 días de vida fueron excluidas del estudio.

D) Procedimiento a partir de los 90 días de vida

Los animales se ubicaron en cajas independientes hasta finalizar el experimento.

D1) Inducción de la preñez: las ratas obesas y las ratas controles fueron apareadas durante la noche con machos sanos de la misma cepa, en las fases pro-estro y estro del ciclo estral, determinadas mediante lavado y frotis vaginal seguido de observación al microscopio óptico (Partec, 100X)³⁶. La mañana en que se confirmó la cópula por la presencia de espermatozoides en el lavado vaginal se consideró el día 0 de la gestación³⁶. Una vez confirmada la preñez, se calculó el índice de Lee y los animales fueron incluidos en uno de los grupos experimentales que aparecen en la tabla 2.

Tabla 2. Características generales de los grupos según tareas de investigación

Tareas	Grupos	Estado de salud de las ratas	Eutanasia	Tamaño muestral (n)
2: RATAS GESTADAS. PERIODO EMBRIONARIO	Ce	Controles gestadas	11,5 días de gestación	16
	Oe	Obesas gestadas	11,5 días de gestación	16
3: RATAS GESTADAS. PERIODO FETAL	Cf	Controles gestadas	20 días de gestación	14
	Of	Obesas gestadas	20 días de gestación	16

D2) Criterios de exclusión: ratas que no se preñaron a los 30 días de iniciar el apareamiento (120 días de vida). Este criterio se basa en que el período de máxima capacidad reproductora en ratas Wistar es entre 12 y 16 semanas de vida, luego de lo cual comienza a declinar la función reproductora. Durante 30 días se producen entre 5 y 6 ciclos estrales, lo cual es suficiente para que una rata fértil quede gestada¹¹⁰.

D3) Procedimiento durante la gestación: a todas las ratas se les determinó los niveles de glucosa en sangre de la cola (glucómetro SUMA SENSOR SXT®) y el peso

(balanza digital Gibertini con sensibilidad 0,01 g) los días cero, 11 y 20 de la gestación, según el grupo de estudio.

D4) Eutanasia y recogida de muestras: la eutanasia se llevó a cabo mediante desangrado por punción de la vena cava inferior, bajo anestesia con tiopental sódico (50 mg/kg de peso corporal, intraperitoneal)¹⁰⁵. A los grupos para estudio de la etapa embrionaria (**Ce**: controles, **Oe**: obesas) se les practicó eutanasia el día 11,5 de la gestación (tarea de investigación 2). El día 11,5 coincide con el final de la etapa más activa del período embrionario, se ha producido el cierre del tubo neural, por lo que malformaciones de esta estructura pueden ser detectadas¹¹¹.

En la tarea de investigación 3, donde se estudió la etapa fetal (**Cf**: controles, **Of**: fetal), la muerte de los animales se produjo el día 20 de la gestación. La elección de ese día se debió a que corresponde con el final de la gestación en los animales utilizados y la extracción de los cuernos uterinos por cesárea es esencial para analizar variables como reabsorciones y muertes fetales^{110,111}.

De todas las ratas se obtuvo sangre total en tubos de cristal para centrifuga con anticoagulante EDTA (ácido etilendiamino tetracético) 5,6 % y un fragmento de hígado que se almacenó a temperatura de -80 °C para determinaciones bioquímicas. Además, se pesó el tejido adiposo visceral (perirrenal, perimesentérico y periovárico) y se almacenó a -80 °C para análisis bioquímico.

Los ovarios fueron extirpados para conteo de cuerpos lúteos bajo estereoscopio (JP Selecta, aumento 20x y 40x)³⁶. Se realizó la disección de los cuernos uterinos y se colocaron en una placa Petri (100 mm) a temperatura ambiente. Con ayuda de tijeras, pinzas y bajo estereoscopio, se eliminó el tejido periuterino, la pared del útero se abrió

en toda su longitud y se retiraron cuidadosamente todas las membranas¹¹². Cada embrión o feto con su placenta se colocó de forma independiente en una placa Petri con NaCl 0,9 % para el estudio de su estructura. En el caso de los fetos se les aplicó un estímulo táctil para la certificación de su viabilidad³⁶.

De cada grupo experimental en la etapa embrionaria fueron almacenados a -80 °C en tubos eppendorf independientes embriones normales, malformados y retrasados para determinaciones bioquímicas. En las ratas del período fetal, se realizó el estudio morfológico de las placentas. Se escogieron aleatoriamente tres placentas por cada rata para análisis bioquímico.

2.5 Condiciones ambientales: los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura (22 ± 3 °C), luz (ciclos constantes de 12 horas luz/oscuridad), humedad relativa (60 ± 5 %) y ventilación adecuada. Se les suministró agua y alimento (pienso granulado, fórmula CMC 1000 producida por CENPALAB) a libre demanda¹⁰⁹.

2.6 Procesamiento de las muestras

2.6.1) Ratas con 11,5 días de gestación

-Sangre: se emplearon 2 mL para el aislamiento de linfocitos. El resto de la sangre se centrifugó a 3 000 rpm por 15 minutos para obtener el plasma, al cual se le añadió 5 µL/mL del antioxidante BHT (butilato de hidroxitolueno, AppliChem) 200 mM en etanol absoluto y se almacenó en alícuotas a -20 °C (el BHT evita la oxidación de los compuestos durante el período de almacenamiento).

-Aislamiento de linfocitos: en tubo de centrifuga con 1 mL de Histopaque-1077 (SIGMA) se agregaron 2 mL de sangre total, a través de las paredes del tubo, lentamente para evitar la mezcla de ambos líquidos. Se centrifugó a 1 200 rpm por 30 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante se pasó a otro tubo de centrifuga. Se repitió la centrifugación por 20 minutos. El anillo de células que contiene los linfocitos se separó y se pasó a un nuevo tubo de centrifuga. El material precipitado que contenía células fue resuspendido con 1,5 mL de buffer $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 0,1 M con EDTA 0,1 mM pH 7,8 y fue almacenado a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ ¹¹³.

-Homogeneización del hígado: la muestra de hígado se descongeló y homogeneizó en hielo [100 mg/600 μL de *buffer* $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 0,1 M con EDTA 0,1 mM, PMSF (fenilmetil sulfonil fluoruro) 0,5 mM, aprotinina 4 μM , leupeptina 4 μM pH 7,8]¹¹² mediante homogeneizador eléctrico (HEIDOLPH) a 30 000 rpm por 1,5 minutos. Con este procedimiento se garantizó la ruptura de más del 90 % de las células, confirmado por visibilización de un frotis en un microscopio de campo invertido (Carl Zeiss). El hígado homogeneizado se centrifugó a $4\text{ }^\circ\text{C}$ y 4 400 rpm durante 20 minutos. A partir del precipitado se extrajo ADN. El sobrenadante fue centrifugado nuevamente a 13 000 rpm a $4\text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 minutos. Se le añadió 5 $\mu\text{l/mL}$ de BHT y se almacenó en alícuotas a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ para determinaciones bioquímicas.

-Extracción de ADN a partir de hígado homogeneizado: se realizó aplicando los principios del método de Bunce¹¹⁴. Por cada 1 mL de homogeneizado se agregaron 135 μL de NaCl 6 M y 400 μL de buffer Tris-HCl 1 M pH 8,2 con EDTA 0,5 M pH 8,0 y SDS (dodecil sulfato de sodio) 10 %, para provocar la lisis de las membranas celulares. Se añadieron 300 μL de una mezcla de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) para

precipitar las proteínas y se centrifugó a 3000 rpm por 15 minutos. Al sobrenadante se le agregó etanol absoluto para precipitar el ADN, el cual fue lavado en dos ocasiones con etanol al 70 % antes de secar y resuspender con Tris-HCl 50 mM pH 8,2.

Se determinó el grado de pureza mediante la razón absorbancia a 260 nm/absorbancia a 280 nm, la cual se consideró adecuada entre 1,8 y 2,0. La concentración de ADN se calculó mediante una fórmula que incluye el valor de la absorbancia a 260 nm. Se expresó en mg/mL.

-Homogeneización del tejido adiposo: el tejido adiposo visceral congelado se homogeneizó en buffer de lisis (las características del buffer aparecen abajo) a razón de 500 μ L/100 mg tejido a 4 °C durante 3 minutos. La homogeneización se llevó a cabo en equipo eléctrico (HEIDOLPH) a velocidad de 30 000 rpm.

Buffer de lisis: Tris 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tritón X-100 1%, Nonidet P-40 1% (NP-40), SDS 0,1 %, PMSF 50 mM y Coctel de inhibidores de proteasas (2 μ L/mL, AMRESCO)¹¹⁵.

El tejido homogeneizado fue centrifugado a 13 000 rpm a 4 °C durante 30 minutos. Se dejó reposar en cámara fría durante 10 minutos. Usando una jeringuilla de 1 mL y aguja 23 G1 se recogió el sobrenadante sin tocar la capa de grasa. El precipitado fue desechado. El sobrenadante fue centrifugado nuevamente bajo iguales condiciones para eliminar los residuos de grasa. Se distribuyó en alícuotas, se le añadió 5 μ L/mL BHT (200 mM) y se almacenó a -80 °C para determinaciones bioquímicas.

2.6.2) Embriones: se utilizaron embriones normales, retrasados y malformados en ambos grupos experimentales. Los embriones normales procedían de madres que tuvieron camadas sin alteraciones.

- **Homogeneización de embriones:** los embriones se descongelaron en hielo, se disgregó el tejido con pipeta y puntas eppendorf. Cada muestra estuvo formada por cinco embriones disueltos en buffer $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 0,1 M, EDTA 0,1 mM a pH 7,8 (500 μL /embrión)³⁵. Los tubos que contenían la muestra a homogeneizar fueron colocados en baño de ultrasonido (mrc, modelo DC150H) con agua a 4 °C durante 5 minutos (40 kHz, 150 w)³⁵. Posteriormente se sometió a centrifugación a 4400 rpm a temperatura controlada de 4 °C. El sobrenadante obtenido fue almacenado en alícuotas a temperatura de -80 °C para su conservación hasta el momento de la realización de los estudios bioquímicos. El precipitado se empleó en la extracción de ADN, siguiendo el procedimiento que se describió previamente para el tejido hepático. En las ratas obesas se prepararon dos muestras de embriones malformados, dos muestras de embriones retrasados y dos muestras de embriones normales de ratas que no tuvieron malformados ni retrasados en sus camadas. En el grupo control se utilizaron dos muestras de embriones normales de ratas que no tuvieron malformados ni retrasados en sus camadas.

2.6.3) Ratas con 20 días de gestación: la sangre, linfocitos, hígado y tejido adiposo homogeneizados, así como el ADN se obtuvieron de igual forma a lo descrito para las ratas con 11,5 días de gestación.

2.6.4) Fetos

- **Análisis de la forma externa de los fetos:** en fresco, a todos los fetos se les determinó el sexo por la distancia ano-genital que, en los machos, es aproximadamente dos veces mayor que en las hembras. Se analizaron externamente

en cuanto a forma y tamaño del cráneo, implantación de las orejas y los ojos (cerrados). En la boca se examinó la integridad del paladar y el labio superior³⁶.

Se analizó la posición, el tamaño y la ausencia o exceso de dedos en las extremidades superiores e inferiores. Las regiones torácica y abdominal fueron examinadas en su porción ventral y dorsal en busca de hematomas, hemorragias, integridad de la piel, defecto del cierre del tubo neural u otra malformación. Se observó la forma y tamaño de la cola. Una vez concluido el examen externo de los fetos la mitad de la camada fue sometida a un procesamiento para el análisis esquelético y la otra mitad fue destinada para el análisis visceral³⁶.

- **Procesamiento de los fetos para la detección de anomalías esqueléticas:** la mitad de los fetos de cada rata se colocaron durante dos semanas en frascos de cristal con tapa con rosca que contenían una solución de alcohol al 70 %. Posteriormente a cada una de las crías se les realizó la apertura del abdomen por debajo de las costillas hasta la región anal. Se confirmó el sexo mediante la observación de los cuernos uterinos, los ovarios o los testículos. Con pinzas de puntas finas se retiraron los órganos torácicos y abdominales. El exceso de grasa en la región dorsal del cuello se extrajo con ayuda de una pinza³⁶.

Luego de la evisceración, se procedió a diafanizar la piel, el tejido muscular y se llevó a cabo la tinción con rojo de alizarina de los tejidos óseos como se representa en la tabla 3. Para la tinción con rojo de alizarina los fetos fueron transferidos cada 24 horas a un nuevo frasco con la solución durante 72 horas (Tabla 3). El rojo de alizarina se fija en las zonas donde hubo deposición de calcio por lo que esto permite visibilizar el esqueleto³⁶.

Tabla 3. Etapas de diafanización y tinción con rojo de alizarina

Solución	Duración
200 mL de hidróxido de potasio (KOH) al 1 %	24 horas
200 mL de KOH 1 % con 0,50 mg de alizarina	24 horas
200mL de KOH 1 % con 0,50 mg de alizarina	24 horas
200mL de KOH 1 % con 0,50 mg de alizarina	24 horas
Solución aclaradora (1parte de alcohol bencílico + 2 partes de glicerina + 2 partes de etanol absoluto)	Mínimo de 48 horas

Terminado el proceso de tinción se mantuvieron en la solución aclaradora hasta la realización del examen esquelético bajo estereoscopio³⁶. Una muestra de la apariencia de los fetos una vez terminada la tinción se muestra en el Anexo 10.

En todos los fetos fueron analizados los huesos del cráneo, las vértebras, las costillas, el esternón, la cintura escapular con los miembros anteriores y la cintura pélvica con los miembros posteriores. Se tuvo en cuenta el número, forma, tamaño, posición, adición, ausencia o fusión de huesos, así como el grado o intensidad de la osificación³⁶. Se efectuó el conteo de los sitios de osificación (esternales, falángicos anteriores, metacarpianos, falángicos posteriores, metatarsianos y vertebras caudales) como indicadores de desarrollo fetal¹¹⁶ (Anexo 11).

-Procesamiento de los fetos para la detección de anomalías viscerales: la mitad de la camada de cada rata fue colocada en frascos de vidrio con cierre hermético que contenían solución fijadora de Bodian (148 mL de agua destilada, 50 mL de formaldehído, 50 mL de ácido acético glacial, 752 mL de alcohol etílico 95 %) como fijador. Los fetos se mantuvieron en el fijador por un período no menor de 30 días hasta la realización del análisis visceral³⁶.

Para la detección de las anomalías viscerales se procedió a la realización de los cortes de Wilson³⁶ con nuestras modificaciones según se describe a continuación. En el Anexo 10 se muestra la representación esquemática de los cortes propuestos por Wilson y los realizados en esta investigación.

Cabeza: se realizó un corte transversal por la región de la boca para observar el paladar, oído interno, canal medular y la tráquea. Posteriormente se efectuaron tres cortes frontales, en la región del septo nasal, a nivel de los globos oculares y a la altura de los hemisferios cerebrales. Con el primero se visibilizó el septo nasal que separa las cavidades nasales. En el segundo se evaluó la simetría de los ojos, el cristalino y los bulbos olfatorios. Los ventrículos laterales y el tercer ventrículo fueron vistos en el último corte³⁶ (Anexo 12).

Cuello, tórax y diafragma: se realizó un corte transversal por debajo del diafragma. Se retiró la porción superior del hígado y se verificó la integridad del diafragma, así como la presencia de herniaciones de vísceras abdominales hacia la cavidad torácica³⁶.

No se realizaron cortes de Wilson transversales finos en la región torácica (Anexo 10) sino que por medio de una toracotomía anterior se procedió al examen de los órganos torácicos: timo, tráquea, pulmones y corazón. En el caso particular del corazón se comprobó su posición y dimensiones. Se le realizó un corte longitudinal para observar el septo interventricular y la salida de los grandes vasos (arterias aorta y pulmonar)³⁶ (Anexo 13).

Abdomen: se realizó una laparotomía, se extrajo el resto de los lóbulos hepáticos y se analizaron el estómago, duodeno y asas intestinales. Luego del examen, se retiraron el estómago y las asas intestinales para la inspección del páncreas, bazo, glándulas adrenales, riñones, uréteres, vejiga y gónadas. Posteriormente se realizó un corte transversal a nivel del hilio renal para analizar las papilas y las pelvis renales³⁶ (Anexo 14). Se identificaron y registraron las anomalías esqueléticas y viscerales en una planilla de recolección de datos. La descripción y clasificación de las anomalías fue hecha utilizando la terminología de las anomalías del desarrollo en mamíferos comunes de laboratorio^{117,118}.

2.6.5) Placentas

-Homogeneización de placentas: las placentas se descongelaron y homogeneizaron siguiendo el procedimiento descrito para el tejido hepático, con la diferencia que la centrifugación se realizó a 15 000 rpm^{41,112}.

2.7 Variables que se determinaron

Tarea de investigación 1

Objetivo 1. Seleccionar un esquema de administración de glutamato monosódico para inducir obesidad en ratas wistar.

a) Variables somatométricas:

- 1) Peso corporal (g): tomado mediante balanza digital Gibertini con sensibilidad 0,01g.
- 2) Longitud corporal (LC) (cm): distancia entre el hocico y el ano, colocando al animal sobre papel milimetrado, en decúbito dorsal¹¹⁹.

3) Índice de Lee: Raíz cúbica del peso corporal (g)/Longitud corporal (cm)⁴⁶.

b) Mortalidad neonatal (%): porcentaje de crías muertas en los 10 primeros días de vida (período neonatal).

c) Frecuencia de obesidad (%): porcentaje de ratas con índice de Lee > 0,300 a los 90 días de vida.

Tareas de investigación 2 y 3

Objetivo 2. Evaluar la influencia de la obesidad pregestacional sobre el estado metabólico, la capacidad antioxidante y el daño oxidativo a biomoléculas en ratas Wistar, su descendencia y la placenta.

l) Variables analizadas en ratas Wistar con 11,5 y 20 días de gestación

a) *Variables somatométricas:* además del peso, la longitud corporal y el índice de Lee, también se determinó la grasa abdominal (g): peso del tejido adiposo periovárico, mesentérico y perirrenal tomado mediante balanza analítica Gibertini con sensibilidad 0,01 g.

b) *Variables nutricionales:*

1. Ingesta alimenticia (g/día): cantidad de alimento consumida en 24 horas⁹⁵.

2. Ingesta energética (kcal/día): ingesta promedio de alimento (g/día) x energía metabolizable de la dieta (2,8 kcal/g)⁹⁵.

3. Ganancia de peso pregestacional (g): diferencia entre el peso final (90 días) y peso inicial (día del destete), mediante balanza digital Gibertini con sensibilidad 0,01 g.

4. Ganancia de peso gestacional (g): diferencia entre el peso inicial (día 0 de la gestación) y el peso final (día de la eutanasia), mediante balanza digital Gibertini con sensibilidad 0,01 g.

c) *Indicadores del estado metabólico en plasma*: glicemia (mM), colesterol (mM), triacilgliceroles (mM), creatinina (μM) y ácido úrico (μM). Estos fueron determinados mediante métodos enzimáticos¹²⁰. La cuantificación de las proteínas totales (g/L) se llevó a cabo mediante el método de Biuret¹²¹. La albúmina (g/L) fue determinada mediante unión a un colorante indicador como el bromocresol verde¹²⁰. En todos los casos anteriores se usaron juegos comerciales HELFA Diagnósticos, QUIMEFA, E.P.B. "Carlos J. Finlay". La concentración de insulina ($\mu\text{UI/ml}$) fue estimada por radioinmunoensayo¹²².

-Índice HOMA-IR (del inglés, homeostasis model assessment of insulin resistance) como medida de resistencia a la insulina. Se calcula mediante la siguiente fórmula: $(\text{insulina en ayunas } \mu\text{UI/ml} \times \text{glucosa en ayunas mmol/l})/22,5$ ^{123,124}.

-Índice TyG (triacilgliceroles-glucosa): como medida de resistencia a la insulina. Se estima mediante el cálculo del logaritmo natural de la siguiente forma: $\ln [\text{triacilgliceroles en ayunas (mg/dL)} \times \text{glucosa en ayunas (mg/dL)}]/2$ ⁹⁷

d) *Marcadores de estrés oxidativo*: los marcadores determinados y las muestras empleadas se resumen en la tabla 4. Todos los indicadores fueron medidos mediante técnicas espectrofotométricas (espectrofotómetro PG Instruments T60U). La determinación de estos marcadores en linfocitos aislados refleja daños que se producen a nivel sistémico¹²⁵.

Tabla 4. Marcadores de estrés oxidativo determinados en muestras obtenidas el día de la eutanasia de ratas gestadas controles y obesas

Marcador de estrés oxidativo	Muestras de ratas con 11,5 días de gestación	Muestras de ratas con 20 días de gestación
MDA	Linfocitos, hígado y tejido adiposo	Linfocitos, hígado y tejido adiposo
PAOP	Linfocitos, hígado y tejido adiposo	Linfocitos, hígado y tejido adiposo
PFD	Hígado	Hígado
NO₃ y NO₂	Plasma	Plasma
GSH	Linfocitos, hígado y tejido adiposo	Linfocitos, hígado y tejido adiposo
SOD	Hígado y tejido adiposo	Hígado y tejido adiposo
CAT	Hígado y tejido adiposo	Hígado y tejido adiposo
Relación SOD/CAT	Hígado y tejido adiposo	Hígado y tejido adiposo

MDA: malonildialdehído. PAOP: productos avanzados de oxidación de proteínas. PFD: productos de la fragmentación de la 2-desoxirribosa. NO₃ y NO₂: nitratos y nitritos. GSH: glutatión reducido. SOD: superóxido dismutasa. CAT: catalasa.

- MDA, como indicador de daño oxidativo a lípidos: se determinó por un método¹²⁶ basado en la reacción de dos moléculas de N-metil-2-fenil indol con una molécula de MDA, a 45 °C en medio ácido. Como producto se obtiene un cromóforo estable que absorbe a 586 nm. La curva patrón se construye utilizando tetrametoxipropano y la concentración se expresa en μM o $\mu\text{mol/mg}$ de proteínas (si se trata de tejidos).
- PAOP, como indicador de daño oxidativo a proteínas: los productos avanzados de oxidación de proteínas se forman por la reacción con el ácido hipocloroso y las cloraminas producidas por mieloperoxidasas en neutrófilos activados. Se determinó siguiendo la transformación de los iones yoduro a yodo diatómico a 340 nm en condiciones ácidas^{127,128}. La concentración se expresa como equivalentes de cloramina T (patrón) en μM o $\mu\text{mol/mg}$ de proteínas (si se trata de tejidos).

- PFD (productos de la fragmentación de la 2-desoxirribosa), como indicador de daño oxidativo al ADN: la determinación se realizó mediante la cuantificación de productos generados como consecuencia de la oxidación de la 2-desoxirribosa, los cuales contienen uno o varios grupos carbonilos (MDA, base-propenales). Estos productos reaccionan a 90 °C con el ácido tiobarbitúrico formando un agregado cromogénico con un máximo de absorbancia a 532 nm¹²⁹. La concentración se expresa en nmoles equivalentes de MDA/mg de ADN.
- NO₃ y NO₂ (nitratos y nitritos), como marcador indirecto de producción de ERO (estado prooxidante) y biodisponibilidad de óxido nítrico: se realizó mediante la cuantificación a 540 nm de la concentración de nitritos presentes en la muestra más los obtenidos por acción de la enzima nitrato reductasa, cuyo sustratos son los nitratos plasmáticos¹³⁰. La concentración se expresa en μM.
- GSH, como indicador de capacidad antioxidante: se determinó por el método de Beutler¹³¹, en el cual el GSH reacciona con el colorante 5,5 ditiobis-2-ácido nitrobenzoico y se genera un compuesto coloreado que absorbe a 412 nm. La concentración se calcula por medio de una curva patrón de GSH y se expresa en mM o mmol/mg de proteínas (si se trata de tejidos).
- SOD, como indicador de capacidad antioxidante: la actividad enzimática se mide siguiendo la cinética de la inhibición de la autooxidación en medio básico del pirogalol. La oxidación del sustrato genera un producto que absorbe a 420 nm¹³². Una unidad de actividad enzimática (UAE) se define como la concentración de SOD que logra inhibir en un 50% la oxidación del pirogalol. Se expresa en UAE/min/mg de proteínas (tejidos).

- CAT, como indicador de capacidad antioxidante: la actividad enzimática se determina mediante estudio cinético en el que se registra la descomposición del H₂O₂ a pH neutro, midiendo la caída de la absorbancia a 240 nm durante 120 segundos¹³³. Una unidad de actividad enzimática se corresponde con 1 μmol de H₂O₂ transformado por minuto. Los resultados son expresados en kU/min/mg de proteínas (tejidos).

- Relación SOD/CAT, como indicador de condiciones prooxidantes: muestra el valor del equilibrio que debe existir entre la generación de H₂O₂, a través de la dismutación del radical superóxido (O₂^{•-}) catalizado por SOD y la detoxificación del mismo mediante su conversión en H₂O por CAT¹³⁴.

II) Marcadores de estrés oxidativo analizados en embriones y placentas

a) En homogeneizado de embriones se determinó PAOP^{127,128} (μmol/mg proteínas)

b) Placenta: MDA¹²⁶ (μmol/mg proteínas), PAOP^{127,128} (μmol/mg proteínas), GSH¹³¹ (mmol/mg proteínas), PFD¹²⁹ (nmol MDA/mg de ADN), SOD¹³² (UAE/min/mg de proteínas), CAT¹³³ (KU/min/mg de proteínas) e índice SOD/CAT¹³⁴.

Objetivos 3. Evaluar la influencia de la obesidad pregestacional sobre la capacidad reproductora en ratas Wistar.

VARIABLES DE CAPACIDAD REPRODUCTORA:

1. Índice de fertilidad (%): número de hembras preñadas x 100/ número de hembras apareadas¹³⁵.

2. Cuerpos lúteos gravídicos: número de cuerpos lúteos encontrados en los ovarios mediante observación con estereoscopio. Indican el número de óvulos fecundados³⁶.

3. Implantaciones: total de sacos gestacionales en ambos cuernos uterinos³⁶.

4. Pérdidas preimplantación (%): $[(\text{número de cuerpos lúteos} - \text{número de implantaciones} / \text{número de cuerpos lúteos}) \times 100]^{36}$
5. Reabsorciones: total de sacos gestacionales sin embrión o feto o con un tejido desorganizado en su interior. Se expresa el porcentaje (%)³³⁻³⁶.
6. Fetos vivos: total de fetos con movimientos espontáneos o ante estímulos táctiles³⁶.
7. Fetos muertos: total de fetos con ausencia de movimientos espontáneos o ante estímulos táctiles. Se expresa el porcentaje (%)³⁶.
8. Pérdidas posimplantación (%): $[(\text{número de implantaciones} - \text{número de fetos vivos} / \text{número de implantaciones}) \times 100]^{36}$
9. Número de descendencia: número promedio de embriones o fetos por rata³⁶.

Objetivo 4. Evaluar la influencia de la obesidad pregestacional sobre el desarrollo embrionario, fetal y placentario.

A) Variables analizadas en la descendencia de ratas con 11,5 días de gestación:

1. Estructurales: fueron determinadas por observación bajo estereoscopio (JP selecta) a 20X y 40X y microscopio Partec a 100X.

1.1 Longitud corporal (LC) (mm): distancia coronilla-rabadilla, mediante papel milimetrado³³⁻³⁵.

1.2 Número de somitas: indicador de diferenciación³³⁻³⁵.

1.3 Clasificación (Anexo 15): los datos son presentados en valores porcentuales.

- Normal: se observa el tubo neural cerrado, las vesículas cerebrales, ópticas y óticas, los esbozos de las extremidades anteriores y el embrión totalmente plegado³³⁻³⁵. Este día corresponde con inicios de la semana cinco del desarrollo en humanos¹³⁶.
- Retrasado: embrión de aspecto normal pero con apertura pequeña del poro posterior del tubo neural. Este criterio se basó en que el poro posterior del tubo neural se cierra poco tiempo después que el anterior, por lo que su apertura en este momento puede representar un retraso del desarrollo y no una malformación^{34,35}.
- Malformado: embrión que no cumplió con las características estructurales esperadas para este momento del desarrollo³³⁻³⁵.

2. Bioquímicas: fueron determinadas en homogeneizado de embriones, mediante técnicas espectrofotométricas (espectrofotómetro PG Instruments T60U):

2.1 Contenido de proteínas ($\mu\text{g}/\text{embrión}$), como indicador de crecimiento³⁵. Se determinó mediante el método de Lowry¹³⁷.

2.2 Contenido de ADN ($\mu\text{g}/\text{embrión}$), como indicador de crecimiento³⁵. Se determinó mediante el método de Bunce¹¹⁴.

B) Variables analizadas en la descendencia de ratas con 20 días de gestación: fueron determinadas en los fetos vivos.

1. Variables de crecimiento y desarrollo somático:

1.1 Peso corporal (g): mediante balanza digital Gibertini con sensibilidad 0,01g¹³⁸

1.3 Longitud corporal (LC) (mm): distancia entre el hocico y la región anal, con el animal en decúbito ventral¹³⁸.

1.4 Diámetro craneano anteroposterior (DAP) (mm): longitud desde la cresta supranasal hasta el borde superior del agujero occipital, medida con un pie de rey¹³⁸.

1.5 Diámetro craneano biparietal (DBP) (mm): longitud entre los bordes superiores de las orejas, medida con un pie de rey¹³⁸.

1.6 Sitios de osificación: número de puntos de osificación esternal, falángica anterior, metacarpiana, falángica posterior, metatarsiana y vértebras caudales. Es un indicador de desarrollo fetal^{36,116}.

2. Frecuencia de anomalías externas (%): porcentaje de fetos que presentaron anomalías estructurales externas³⁶.

3. Frecuencia de anomalías esqueléticas (%): porcentaje de fetos que presentaron alteraciones estructurales del sistema esquelético³⁶.

4. Frecuencia de anomalías viscerales (%): porcentaje de fetos que presentaron alteraciones estructurales viscerales³⁶.

C) Variables analizadas en las placentas:

1. Peso (g), mediante balanza digital Gibertini con sensibilidad 0,01g¹³⁹

2. Índice placentario, indicador de eficiencia placentaria: peso placenta (g)/peso fetal (g)¹³⁹.

Objetivo 5. Determinar si existe relación entre la presencia de anomalías congénitas en la descendencia de ratas obesas y el estado redox sistémico materno.

Se correlacionó la presencia de anomalías congénitas en la descendencia con las concentraciones de marcadores sistémicos maternos de daño a biomoléculas (MDA, PAOP y PFD) y de defensa antioxidante (GSH).

2.8 Control de los sesgos del diseño: se aplicó un muestreo aleatorio simple para la selección de las ratas que formaron cada grupo. De igual forma se procedió para la selección de los embriones y placentas que se emplearon para las determinaciones bioquímicas.

2.9 Control de la calidad del análisis de las variables: todas las determinaciones bioquímicas se realizaron por duplicado. El análisis estructural de los embriones, fetos vivos y placentas se efectuó por personal entrenado.

2.10 Procesamiento estadístico: las variables bioquímicas en los embriones se analizaron mediante estadística descriptiva, teniendo en cuenta el pequeño número de muestras. Los resultados del resto de las variables se procesaron mediante el programa INFOSTAT y el paquete Estadística versión 8.0. Para las comparaciones entre los grupos experimentales se usó la prueba no paramétrica U Mann-Whitney debido a que la mayoría de las variables no mostraron una distribución normal. La prueba exacta de Fisher fue empleada para la comparación de valores porcentuales. Para el establecimiento de la relación entre las variables se determinó el coeficiente de correlación de Spearman (R) y el coeficiente de correlación punto biserial (R•bis).

Los datos se muestran como valores de la media \pm la desviación estándar, número de casos y porcentajes. Las diferencias se consideraron significativas con valores de p menores que 0,05.

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1 Tarea de Investigación 1. Selección del esquema de administración para inducir obesidad por el glutamato monosódico en ratas Wistar

El porcentaje de muertes neonatales fue superior en las ratas inyectadas con GMS con relación a los controles en todos los esquemas de administración ensayados, siendo del 100 % con el esquema 17A. La mortalidad fue mayor con el inicio de la administración del GMS el día 1 de vida, con una frecuencia diaria y con la utilización de la vía intraperitoneal. No hubo diferencias significativas con la aplicación de 5 o 7 dosis (Tabla 5).

Tabla 5. Mortalidad neonatal según criterios tenidos en cuenta para la formación de los esquemas de administración de glutamato monosódico o NaCl 0,9 % ensayados

Criterios	Grupo	Mortalidad (%)
Grupo experimental	CON	1/72 (1,39)
	GMS	54/82 (65,85) †
Vía de administración	Intraperitoneal	40/90 (44,44) ‡
	Subcutánea	15/64 (23,44)
Número de dosis	5 dosis	24/76 (31,58)
	7 dosis	31/78 (39,74)
Frecuencia de la administración	Diario	45/116 (38,79) #
	Días alternos	10/48 (20,83)
Comienzo de la administración	Día 1 de vida	34/77 (44,16) Σ
	Día 2 de vida	22/77 (28,57)

CON: inyectadas con NaCl 0,9% (controles). GMS: inyectadas con glutamato monosódico.

† Diferencia significativa comparado con el grupo control; $p=0,0000$ (Prueba exacta de Fisher)

‡ Diferencia significativa entre vía intraperitoneal y subcutánea; $p=0,0056$ (Prueba exacta de Fisher)

Diferencia significativa entre la administración diaria y en días alternos; $p=0,0192$ (Prueba exacta de Fisher)

Σ Diferencia significativa entre el comienzo de la administración el día 1 de vida y el día 2 de vida; $p=0,0325$ (Prueba exacta de Fisher)

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el peso de las ratas inyectadas con GMS y el de las ratas a las que se les administró NaCl 0,9 % (controles) a los 90 días de vida, con los esquemas de administración en los que no hubo una mortalidad del 100 %. La longitud corporal resultó diferente estadísticamente entre los grupos, excepto con el esquema de administración I5B. El 100 % de las ratas tratadas con GMS que alcanzaron la vida adulta, se hicieron obesas. El índice de Lee fue similar entre las ratas a las que se les aplicó 5 dosis y a las que se les aplicó 7 dosis de GMS. Ello indica que se alcanzó un grado de obesidad semejante con los esquemas de administración probados (Tabla 6).

Tabla 6. Variables somatométricas y frecuencia de obesidad según esquemas de administración de glutamato monosódico o NaCl 0,9 %

Esquema	Grupo	Peso (g)	LC (cm)	Índice de Lee	Frecuencia Obesidad (%)
I5A	CON	226,6 ± 8,5	20,5 ± 0,4	0,297 ± 0,0	1/10 (10)
	GMS	225,0 ± 1,4	18,8 ± 1,1*	0,325 ± 0,0*	2/2 (100)
I5B	CON	226,8 ± 30,1	20,6 ± 0,7	0,295 ± 0,0	2/10 (20)
	GMS	256,5 ± 27,9	19,8 ± 0,4	0,320 ± 0,0*	4/4 (100)
I7B	CON	251,8 ± 32,4	21,3 ± 1,0	0,296 ± 0,0	0/10 (0)
	GMS	226,8 ± 16,1	18,5 ± 0,7*	0,330 ± 0,0*	5/5 (100)
S5A	CON	263,3 ± 6,6	21,7 ± 0,3	0,296 ± 0,0	0/8 (0)
	GMS	256,8 ± 16,2	19,2 ± 0,5*	0,321 ± 0,0*	4/4 (100)
S5B	CON	247,8 ± 26,2	21,0 ± 0,5	0,299 ± 0,0	2/8 (25)
	GMS	235,7 ± 13,4	18,9 ± 1,0*	0,320 ± 0,0*	6/6 (100)
S7A	CON	251,0 ± 10,4	21,1 ± 0,3	0,298 ± 0,0	1/8 (12,5)
	GMS	252,8 ± 17,9	19,1 ± 0,5*	0,330 ± 0,0*	2/2 (100)
S7B	CON	247,1 ± 26,5	21,1 ± 0,6	0,297 ± 0,0	1/8 (12,5)
	GMS	247,6 ± 13,7	19,1 ± 0,7*	0,330 ± 0,0*	5/5 (100)

Se presenta el valor promedio ± la desviación estándar de cada variable, excepto la última variable que es expresada en porcentaje. I5A: administración de 5 dosis, diario, a partir del día 1 de vida, intraperitoneal. I5B: administración de 5 dosis, en días alternos, a partir del

día 2 de vida, intraperitoneal. I7B: administración de 7 dosis, diario, a partir del día 2 de vida, intraperitoneal. S5A: administración de 5 dosis, diario, a partir del día 1 de vida, subcutáneo. S5B: administración de 5 dosis, en días alternos, a partir del día 2 de vida, subcutáneo. S7A: administración de 7 dosis, diario, a partir del día 1 de vida, subcutáneo. S7B: administración de 7 dosis, diario, a partir del día 2 de vida, subcutáneo. GMS: inyectadas con glutamato monosódico. CON: inyectadas con NaCl 0,9% (controles). LC: longitud corporal. * Diferencia significativa comparado con el grupo control; $p < 0,05$ (Prueba U de Mann-Whitney)

Teniendo en cuenta estos resultados se seleccionó el esquema S5B, donde se aplica cinco dosis de GMS (4 mg/g de peso corporal), en días alternos por vía subcutánea y comenzando la administración el día 2 de vida (días 2, 4, 6, 8 y 10 de vida).

3.2 Tareas de investigación 2 y 3. Evaluación de la influencia de la obesidad pregestacional inducida por glutamato monosódico sobre el desarrollo embrionario, fetal y placentario en ratas

3.2.1 Ratas con 11,5 días de gestación y ratas con 20 días de gestación

En las tareas 2 y 3 las ratas obesas (Oe y Of) presentaron menor longitud corporal que los controles (Ce y Cf). No hubo diferencias significativas en relación con el peso corporal entre obesas y controles, sin embargo la grasa abdominal se incrementó significativamente en las ratas obesas (Tabla 7) (Anexo 16).

El tiempo promedio de evolución de la obesidad en las ratas con 11,5 días de gestación fue de 26 días, mientras que el de las ratas con 20 días de gestación fue de 31 días. La ingesta alimenticia y energética fue inferior en las ratas obesas. La ganancia de peso pregestacional y la gestacional fue menor en las obesas (Tabla 8).

Tabla 7. Variables somatométricas en ratas controles y obesas

Variab les	Ce (n=16)	Oe (n=16)	Cf (n=14)	Of (n=16)
Peso corporal (g)	247,3 ±25,4	240,7 ±23,5	258,0 ±22,3	246,7 ±24,2
LC (cm)	21,3 ±0,7	18,6 ±0,8*	21,5 ±0,7	19,0 ±0,5*
Índice Lee	0,294 ±0,0	0,334 ±0,0*	0,296 ±0,0	0,328 ±0,0*
Grasa abdominal (g)	16,1 ±4,5	23,7 ±6,2*	14,1 ±4,0	23,1 ±9,2*

Se presenta el valor promedio ± la desviación estándar de las variables. LC: longitud corporal; Ce: ratas controles con 11,5 días de gestación; Oe: ratas obesas con 11,5 días de gestación; Cf: ratas controles con 20 días de gestación; Of: ratas obesas con 20 días de gestación. * Diferencia significativa comparado con el grupo control; p < 0,05 (Prueba U de Mann-Whitney)

Tabla 8. Variables nutricionales en ratas controles y obesas

Variab les	Ce (n=16)	Oe (n=16)	Cf (n=14)	Of (n=16)
Ingesta alimenticia (g/día)	18,1 ±2,0	16,7 ±1,2*	18,9 ±2,3	17,4 ±1,3*
Ingesta energética (kcal/día)	50,6 ±5,5	46,7 ±3,3*	52,6 ±6,4	48,8 ±3,7*
Ganancia de peso pregestacional (g)	206,0 ±23,2	180,4±20,7*	219,8 ±18,2	203,8 ±22,9*
Ganancia de peso gestacional (g)	39,6 ±14,6	29,6 ±11,3*	98,4 ±19,8	65,4 ±20,8*

Se presenta el valor promedio ± la desviación estándar de las variables. Ce: ratas controles con 11,5 días de gestación; Oe: ratas obesas con 11,5 días de gestación; Cf: ratas controles con 20 días de gestación; Of: ratas obesas con 20 días de gestación. * Diferencia significativa comparado con el grupo control; p < 0,05 (Prueba U de Mann-Whitney)

Las ratas obesas con 11,5 días de gestación mostraron niveles de triacilgliceroles y albúmina plasmática superiores a los controles. Hubo correlación positiva entre el índice de Lee y los niveles plasmáticos de triacilgliceroles (R=0,3769; p < 0,05). El resto de las variables metabólicas no mostraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 9).

En las ratas obesas con 20 días de gestación se observó disminución en las concentraciones de creatinina y albúmina. No se encontraron diferencias significativas en las demás variables metabólicas (Tabla 9). Al comparar los grupos

de ratas con 11,5 días de gestación con los de 20 días de gestación (Ce vs Cf y Oe vs Of) se observó que los últimos presentaron menores niveles de glicemia y mayores de colesterol, triacilgliceroles, índice HOMA e índice TyG ($p < 0,05$).

Tabla 9. Indicadores del estado metabólico en ratas gestadas controles y obesas

Variables	Ce (n=16)	Oe (n=16)	Cf (n=14)	Of (n=16)
Glicemia (mM)	6,8 ±0,8	6,9 ±1,0	5,0 ±0,9	4,8±0,4
Colesterol (mM)	1,1 ±0,3	1,2 ±0,4	1,9 ±0,3	1,8 ±0,8
Triacilgliceroles (mM)	0,9 ±0,5	2,0 ±2,2*	5,2 ±2,8	6,9 ±5,7
Insulina (µUI/mL)	23,9 ±16,1	28,0 ±20,0	21,3 ±12,5	15,7 ±7,5
HOMA-IR	7,6 ±5,6	8,1±5,6	3,7 ±2,3	2,7±1,3
Índice TyG	8,4 ±0,5	8,9 ±0,9	9,5 ±0,5	9,6 ±0,8
Ácido úrico (mM)	119,7 ±89,1	115,5 ±64,1	161,4 ±84,9	141,0 ±68,1
Creatinina (µM)	43,6 ±8,0	40,7 ±10,8	52,6±15,0	37,7 ±15,2*
Proteínas totales (g/L)	55,6±13,8	57,6±15,9	62,6 ±7,8	62,6 ±21,9
Albúmina (g/L)	24,3 ±8,9	33,4 ±6,2*	42,1 ±13,1	33,4 ±5,1*

Se presenta el valor promedio ± la desviación estándar de cada variable; Ce: ratas controles con 11,5 días de gestación; Oe: ratas obesas con 11,5 días de gestación; Cf: ratas controles con 20 días de gestación; Of: ratas obesas con 20 días de gestación; HOMA: modelo homeostático de Mathews para determinar resistencia a la insulina (IR); TyG: triacilgliceroles-glucosa. * Diferencia significativa comparado con grupo control; $p < 0,05$ (Prueba U de Mann-Whitney).

En las ratas con 11,5 días de gestación no se presentaron diferencias significativas en los marcadores de estrés oxidativo sistémico (linfocitos o plasma) y tisular (hígado y tejido adiposo) entre los grupos (Tablas 10 y 11). Sin embargo las ratas obesas con 11,5 días de gestación que tuvieron embriones malformados presentaron niveles sistémicos de GSH inferiores a las obesas y a los controles sin

embriones malformados en su descendencia. Las ratas controles con embriones malformados no mostraron diferencias en los niveles de GSH sistémico con relación a los controles sin embriones malformados (Figura 2). Además, en el grupo de las obesas, se encontró correlación entre la disminución de los niveles de GSH al nivel sistémico y la presencia de malformaciones en la descendencia ($R_{\text{Bis}}=0,6199$; $p < 0,05$)

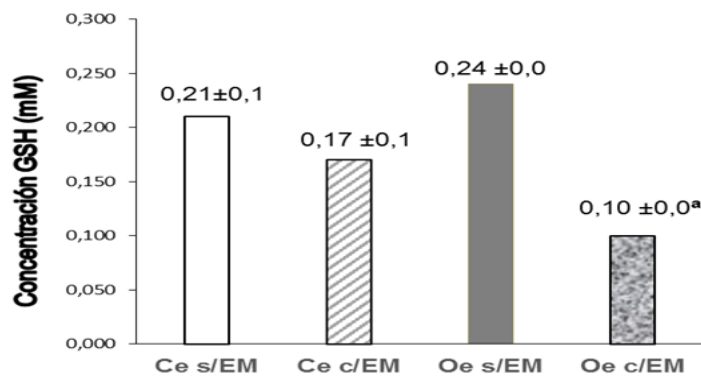


Figura 2. Niveles de glutatión reducido en ratas controles y obesas con 11,5 días de gestación. Se presenta el valor promedio de la variable. Grupos formados según la presencia o no de embriones malformados. Ce s/EM: Ratas controles sin embriones malformados; Ce c/EM: Ratas controles con embriones malformados; Oe s/EM: Ratas obesas sin embriones malformados; Oe c/EM: Ratas obesas con embriones malformados; GSH: glutatión reducido. ^a Diferencia significativa comparado con Oe s/EM y Ce s/EM; $p < 0,05$ (Prueba U de Mann-Whitney).

Las ratas obesas con 20 días de gestación exhibieron concentraciones superiores de MDA tanto a nivel sistémico como en tejido adiposo. Se encontraron mayores niveles plasmáticos de nitratos y nitritos en las ratas obesas con 20 días de gestación. En este mismo grupo se constató disminución de la actividad de la enzima catalasa e incremento del índice SOD/CAT hepáticos. Una disminución de la SOD fue observada en el tejido adiposo. Los demás indicadores de estrés

oxidativo en ratas con 20 días de gestación no mostraron diferencias estadísticamente significativas (Tablas 10 y 11).

Tabla 10. Marcadores de estrés oxidativo sistémico en ratas gestadas controles y obesas

Variables	Ce (n=16)	Oe (n=16)	Cf (n=14)	Of (n=16)
[NO₃+NO₂] (μM)	53,2 ±17,5	55,9 ±15,5	125,4 ±81,2	232,3 ±121,1*
GSH (mM)	0,20 ±0,1	0,17 ±0,1	0,18 ±0,1	0,23 ±0,1
PFD (nmol MDA/mg ADN)	6,8 ±2,5	6,0 ±1,7	1,7 ±0,4	2,1 ±0,9
PAOP (μM)	0,06 ±0,0	0,10 ±0,1	0,09 ±0,1	0,06 ±0,0
MDA (μM)	10,1 ±5,0	16,3 ±21,0	5,4 ±3,2	12,0 ±3,5*

Se presenta el valor promedio ± la desviación estándar de cada variable. Ce: ratas controles con 11,5 días de gestación; Oe: ratas obesas con 11,5 días de gestación; Cf: ratas controles con 20 días de gestación; Of: ratas obesas con 20 días de gestación. NO₃+NO₂: nitratos y nitritos; GSH: glutatión reducido; PFD: productos de la fragmentación de la 2-dexosirribosa; PAOP: productos avanzados de la oxidación de proteínas; MDA: malonildialdehído. * Diferencia significativa comparado con grupo control; p < 0,05 (Prueba U de Mann-Whitney).

En ratas con 20 días de gestación se constató aumento significativo (p < 0,05) en los niveles plasmáticos de nitratos y nitritos con respecto a las ratas con 11,5 días de gestación (Ce vs Cf y Oe vs Of). Al nivel del tejido adiposo se observó incremento en la concentración de GSH, mayor actividad de enzimas antioxidantes (SOD, CAT) y mayor daño oxidativo a lípidos (MDA) y proteínas (PAOP) en ratas con 20 días de gestación, con significación estadística (p < 0,05). Las ratas obesas con 20 días de gestación (Of) tuvieron además niveles superiores de MDA, aumento de la actividad de SOD y disminución de la catalasa con incremento del índice SOD/CAT en tejido hepático comparado con las ratas obesas con 11,5 días de gestación (Oe), con diferencias significativas (p < 0,05).

Tabla 11. Marcadores de estrés oxidativo tisular en ratas gestadas controles y obesas

Variables	Ce (n=16)	Oe (n=16)	Cf (n=14)	Of (n=16)
HIGADO				
GSH (mmol/mg de proteínas)	0,50 ±0,2	0,52 ±0,2	0,04 ±0,0	0,07 ±0,0
SOD (UAE/min/mg de proteínas)	3,5 ±1,6	2,8 ±0,5	3,9 ±1,9	4,6 ±2,0
CAT (KU/min/mg de proteínas)	4,3 ±2,0	4,5 ±2,1	3,7 ±1,4	2,6 ±1,0*
Índice SOD/CAT	0,95 ±0,6	0,85 ±0,7	1,2 ±0,5	1,9 ±0,9*
PAOP (µmol/mg de proteínas)	0,02 ±0,0	0,02 ±0,0	0,02 ±0,0	0,03 ±0,0
MDA (µmol/mg de proteínas)	0,77 ±0,5	0,62 ±0,3	0,88 ±0,5	1,13 ±0,8
TEJIDO ADIPOSO				
GSH (mmol/mg de proteínas)	0,63 ±0,4	0,57 ±0,3	5,3 ±2,4	4,2 ±2,8
SOD (UAE/min/mg de proteínas)	6,2 ±3,9	6,8 ±5,9	211,4 ±75,2	129,0±58,5*
CAT (KU/min/mg de proteínas)	0,13 ±0,1	0,08 ±0,0	2,5 ±1,4	2,0 ±1,2
Índice SOD/CAT	56,8 ±47,0	60,3 ±44,6	100,5 ±52,3	99,7±89,9
PAOP (µmol/mg de proteínas)	0,28 ±0,2	0,36 ±0,2	2,5 ±1,5	3,5 ±3,1
MDA (µmol/mg de proteínas)	4,8 ±3,6	5,1 ±2,5	71,7±47,8	128,1±49,6*

Se presenta el valor promedio ± la desviación estándar de cada variable. Ce: ratas controles con 11,5 días de gestación; Oe: ratas obesas con 11,5 días de gestación; Cf: ratas controles con 20 días de gestación; Of: ratas obesas con 20 días de gestación. GSH: glutatión reducido; SOD: superóxido dismutasa; CAT: catalasa PAOP: productos avanzados de la oxidación de proteínas; MDA: malonildialdehído. * Diferencia significativa comparado con grupo control; p < 0,05 (Prueba U de Mann-Whitney).

Las ratas obesas (Oe y Of) presentaron menor índice de fertilidad, así como disminución en el número de cuerpos lúteos, implantaciones y de su descendencia (embriones o fetos) comparado con su respectivo grupo control (Ce o Cf) (Tabla

12). Las pérdidas preimplantación fueron significativamente superiores en las ratas obesas con 11,5 días de gestación. La proporción de reabsorciones fue similar en las ratas con 11,5 días de gestación (Tabla 12) (Anexo 15 y 17).

En las ratas con 20 días de gestación no hubo diferencias significativas entre los grupos en cuanto a las pérdidas preimplantación. Sin embargo, las pérdidas posimplantación se incrementaron en las ratas obesas (Of), a expensas de las muertes fetales ocurridas en este grupo experimental (Tabla 12) (Anexo 17).

Tabla 12. Variables de capacidad reproductora en ratas controles y obesas

Variables	Ce (n=16)	Oe (n=16)	Cf (n=14)	Of (n=16)
Índice de Fertilidad (%)	16/18 (88,9)	16/29 (54,2) [†]	14/15 (93,3)	16/26 (61,5) [†]
Cuerpos lúteos				
N	227	186	177	159
Media ± DS	14,2 ±2,2	11,6 ±2,6*	12,6 ±2,4	9,9 ±2,3*
Implantaciones				
N	205	147	164	145
Media ± DS	12,8 ±3,5	9,2 ±3,0*	11,7 ±2,9	9,1 ±3,3*
Pérdidas preimplantación (%)	9,7	21,0 [†]	7,3	8,8
Reabsorciones N (%)	47/205 (22,9)	43/147 (29,3)	2/164 (1,2)	2/145 (1,4)
Embriones o Fetos				
N	158	104	162	143
Media ± DS	9,9 ±3,9	6,5 ± 4,0*	11,6 ±3,0	8,9 ±3,3*
Fetos vivos N (%)			161 (99,4)	136 (95,1) [†]
Fetos muertos N (%)			1(0,6)	7 (5,2) [†]
Pérdidas posimplantación (%)			1,8	6,2 [†]

Se presenta el total (N) y el valor promedio ± la desviación estándar de las variables o porcentaje de las mismas. Ce: ratas controles con 11,5 días de gestación; Oe: ratas obesas con 11,5 días de gestación; Cf: ratas controles con 20 días de gestación; Of: ratas obesas con 20 días de gestación; DS: desviación estándar. * Diferencia significativa

comparado con grupo control; $p < 0,05$ (Prueba U de Mann-Whitney). † Diferencia significativa comparado con grupo control; $p < 0,05$ (Prueba exacta de Fisher).

3.2.2 Descendencia de ratas con 11,5 días de gestación

Los embriones de las ratas obesas tuvieron menor longitud corporal, número de somitas, contenido de ADN y proteínas que los embriones del grupo control, lo que indica menor crecimiento y desarrollo de estos (Figura 3).

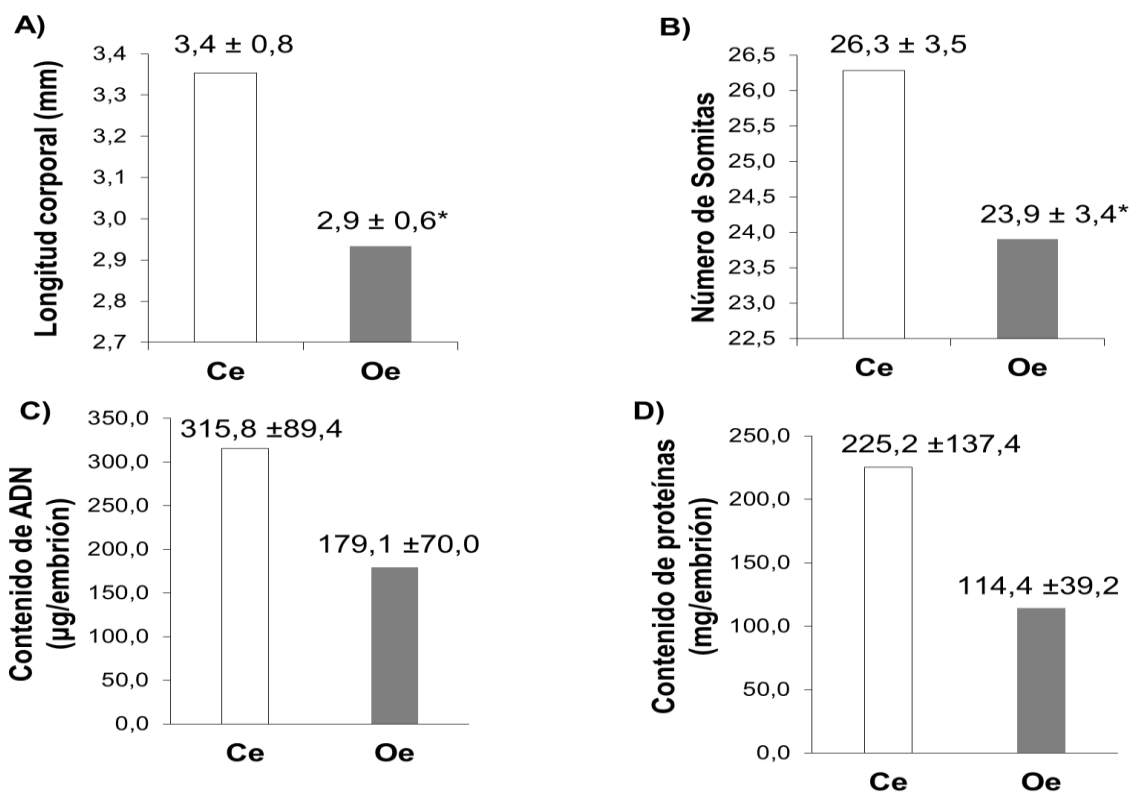


Figura 3. Variables de crecimiento y desarrollo embrionario. Ce: ratas controles con 11,5 días de gestación; Oe: ratas obesas con 11,5 días de gestación. A y B: * Diferencia significativa comparado con grupo control; $p < 0,05$ (Prueba U de Mann-Whitney). C y D: Estadística descriptiva.

Se determinó la presencia de malformaciones congénitas en la descendencia, especialmente los DTN tales como: microcefalia, apertura anterior, posterior y dorsal del tubo neural. Los defectos de rotación y la no definición de las vesículas cerebrales también fueron identificados (Anexo 15). El porcentaje de embriones

retrasados y malformados fue superior en el grupo de las obesas. Este porcentaje fue calculado a partir del número de embriones que pudieron ser clasificados (embriones útiles) (Tabla13) (Anexo 15).

Tabla 13. Clasificación de los embriones de ratas controles y obesas

Variables	Ce (n=16)	Oe (n=16)
Embriones útiles (N)	148	93
Embriones normales N (%)	140 (94,6)	64 (68,8)
Embriones retrasados N (%)	3 (2,0)	16 (17,2) [†]
Embriones malformados N (%)	5 (3,4)	13 (14,0) [†]

Se presenta el total (N) y el porcentaje de las variables o el valor promedio \pm la desviación estándar de las mismas. Ce: ratas controles con 11,5 días de gestación; Oe: ratas obesas con 11,5 días de gestación. [†] Diferencia significativa comparado con grupo control; $p < 0,05$ (Prueba exacta de Fisher).

Se compararon la longitud corporal, el número de somitas, contenido de ADN y proteínas de los embriones malformados, retrasados y normales. Los malformados fueron los de menor longitud corporal, número de somitas, contenido de ADN y proteínas seguidos por los embriones retrasados, los que presentaron valores de estas variables inferiores a los embriones normales (Figura 4). Se encontró correlación positiva entre la longitud corporal de los embriones y el número de somitas. La presencia de malformaciones se correlacionó con disminución de la longitud corporal y el número de somitas en los embriones (Tabla 14).

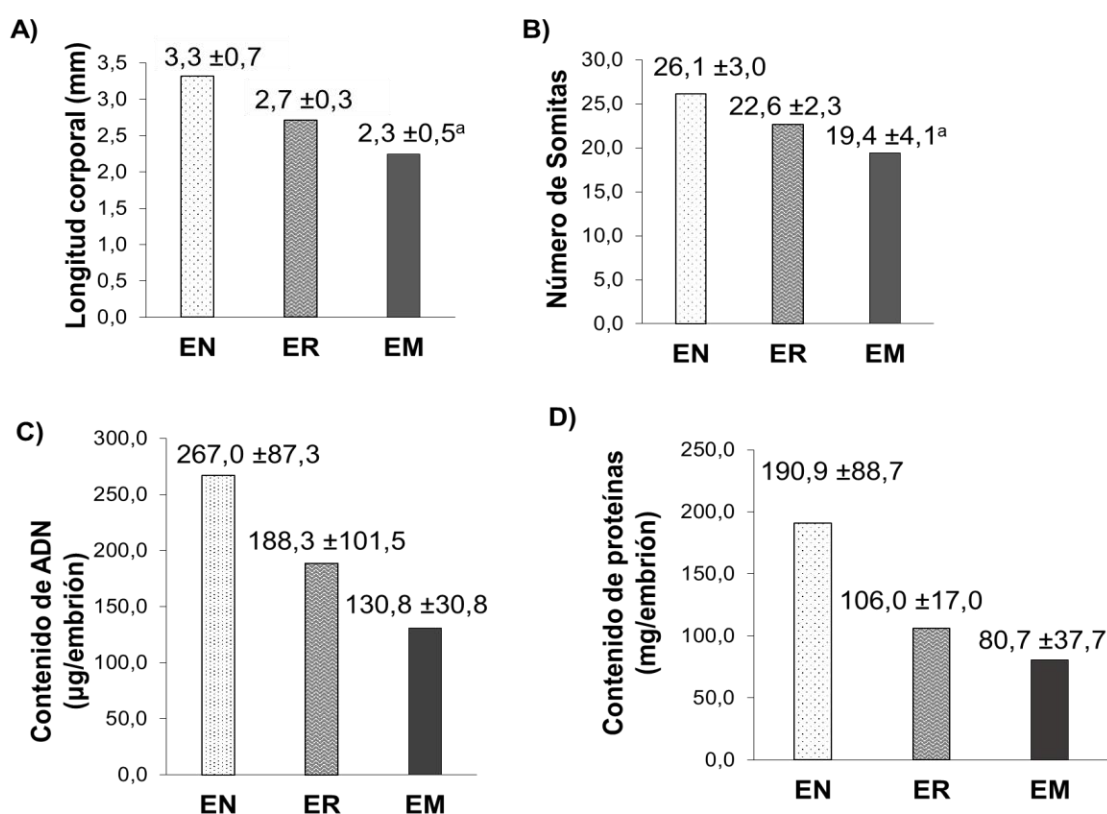


Figura 4. Variables de crecimiento y desarrollo embrionario según clasificación de los embriones. EN: embriones normales, ER: embriones retrasados, EM: embriones malformados. Se presenta el valor promedio \pm la desviación estándar de cada variable. ^a Diferencia estadísticamente significativa; $p < 0,05$ (Prueba Kruskal-Wallis). C y D: Estadística descriptiva.

Tabla 14. Relación entre la presencia de malformaciones y el crecimiento y desarrollo embrionario

	Número de Somitas		Longitud corporal	Número de Somitas corporal
	R		R•Bis	R•Bis
Longitud corporal	0,6913*	malformación (ausencia o presencia)	0,4164*	0,2799*

R: coeficiente de correlación de Spearman; R•Bis: coeficiente de correlación punto biserial * $p < 0,05$.

Las anomalías generalmente no se presentaron de forma aislada. Una mayor severidad de las malformaciones se constató en la descendencia de las ratas obesas, donde predominaron las anomalías múltiples (Tabla 15).

Tabla 15. Anomalías observadas en embriones de ratas controles y obesas

ANOMALÍAS	Ce	Oe	TOTAL
AISLADAS			
Apertura posterior amplia del tubo neural	0	2	2
Apertura anterior del tubo neural	2	0	2
Microcefalia	0	1	1
MÚLTIPLES			
Apertura posterior amplia y/o anterior del tubo neural y microcefalia.	2	8	10
Apertura posterior amplia y/o anterior del tubo neural, microcefalia y malrotación.	1	0	1
Apertura anterior y dorsal del tubo neural.	0	1	1
Apertura posterior amplia del tubo neural y vesículas cefálicas poco definidas.	0	1	1
TOTAL	5	13	18

Se muestra el número de embriones con cada anomalía por grupo y el total de embriones con cada anomalía en el estudio. Ce: ratas controles con 11,5 días de gestación; Oe: ratas obesas con 11,5 días de gestación.

Los niveles de PAOP fueron mayores en los embriones de ratas obesas (Figura 5).

Así mismo, los embriones alterados (malformados y retrasados) exhibieron una concentración de PAOP superior a la de los embriones normales (Figura 5).

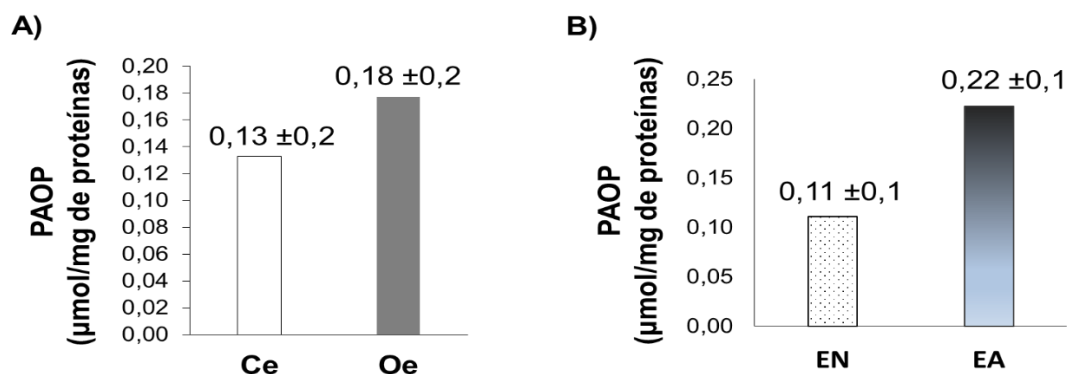


Figura 5. Niveles de PAOP en embriones. A) Según grupo experimental. B) Según clasificación de los embriones. PAOP: productos avanzados de la oxidación de proteínas. Ce: ratas controles con 11,5 días de gestación; Oe: ratas obesas con

11,5 días de gestación; EN: embriones normales. EA: embriones alterados (retrasados y malformados). Se presenta el valor promedio \pm la desviación estándar de cada variable. Estadística descriptiva.

3.2.3 Descendencia de ratas con 20 días de gestación

Con relación a los indicadores de crecimiento somático y desarrollo fetal, los descendientes de las ratas obesas presentaron menor peso y diámetro craneano anteroposterior que los fetos del grupo control. Las demás variables morfométricas no mostraron diferencia entre ambos grupos (Tabla 16).

Tabla 16. Indicadores de crecimiento somático y desarrollo fetal

Variables	Cf	Of
Peso (g)	3,5 \pm 0,4	3,4 \pm 0,4*
Longitud corporal (mm)	34,4 \pm 1,7	34,2 \pm 1,8
DBP (mm)	7,8 \pm 1,0	7,7 \pm 0,9
DAP (mm)	11,4 \pm 1,4	10,7 \pm 1,3*
Sitios de osificación		
Falángicos anteriores	0,00 \pm 0,0	0,03 \pm 0,2
Metacarpianos	3,0 \pm 0,4	3,1 \pm 0,4
Falángicos posteriores	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
Metatarsianos	3,8 \pm 0,4	4,0 \pm 0,2
Vértebras caudales	4,0 \pm 0,7	3,9 \pm 0,9
Esternales	4,4 \pm 0,7	4,2 \pm 0,9

Se presenta el valor promedio \pm la desviación estándar de cada variable. Cf: ratas controles con 20 días de gestación; Of: ratas obesas con 20 días de gestación. DBP: diámetro craneano biparietal; DAP: diámetro craneano anteroposterior. * Diferencia significativa comparado con grupo control; $p < 0,05$ (Prueba U de Mann-Whitney).

No se encontraron fetos con alteración en su forma externa en ninguno de los grupos (la gastroquisis se incluyó dentro de los defectos viscerales) (Tabla 17). La frecuencia de anomalías esqueléticas y viscerales en la descendencia de las ratas obesas estuvo por debajo de la mostrada por los fetos de las ratas controles (Tablas

17 y 19) (Anexo 18 y 19). No se hallaron fetos con DNT ni con malformaciones cardiovasculares en la descendencia de las obesas. No se observaron fetos con anomalías viscerales múltiples en ninguno de los grupos experimentales.

Tabla 17. Frecuencia de anomalías externas y esqueléticas en fetos de ratas controles y obesas

	Cf	Of
Fetos con anomalías externas (%)	0/162 (0,0)	0/143 (0,0)
Fetos con anomalías esqueléticas (%)	26/65 (40,0) [†]	9/61(14,8)
Osificación incompleta del supraoccipital (%)	12 (18,5) [†]	3 (4,9)
Osificación incompleta de centros esternales (%)	1(1,5)	0 (0,0)
No osificación de centros esternales (%)	0 (0,0)	1(1,6)
Costilla corta (%)	1(1,5)	0 (0,0)
Ausencia de costilla (%)	0 (0,0)	1(1,64)
No osificación de centros metacarpianos (%)	0 (0,0)	2 (3,3)
Anomalías esqueléticas múltiples (%)	12 (18,5) [†]	2 (3,3)

Se presenta el valor total y el porcentaje de las anomalías. Cf: ratas controles con 20 días de gestación; Of: ratas obesas con 20 días de gestación. [†]p < 0,05 comparado con grupo control (Prueba exacta de Fisher)

La osificación incompleta del hueso supraoccipital, las anomalías esqueléticas múltiples y el uréter acodado o alargado en forma de S (no asociado a otro defecto del tracto urinario) fueron las alteraciones estructurales cuya frecuencia mostró diferencias estadísticas entre los grupos (Tablas 17, 18 y 19) (Anexo 18 y 19). No se encontró correlación entre los marcadores de estrés oxidativo sistémicos y la presencia de anomalías esqueléticas y viscerales.

Tabla 18. Anomalías esqueléticas múltiples observadas en fetos de ratas controles y obesas

Anomalías múltiples	Cf	Of
Osificación incompleta del supraoccipital e interparietal.	4	0
Osificación incompleta del supraoccipital, costillas arqueadas y engrosadas.	2	0
Osificación incompleta del supraoccipital, no osificación de centros esternales.	1	1
Osificación incompleta del supraoccipital, ausencia de costilla.	1	0
Osificación incompleta del supraoccipital, osificación incompleta de centros esternales.	1	0
Osificación incompleta del supraoccipital, osificación incompleta de centros esternales, costilla corta.	1	0
Osificación incompleta del interparietal, costillas arqueadas y engrosadas.	1	0
No osificación de centros esternales, costillas arqueadas y engrosadas.	1	0
Ausencia de costilla, no osificación de cuerpos vertebrales.	0	1
Total	12	2

Se muestra el número de fetos con cada anomalía múltiple por grupo. Cf: ratas controles con 20 días de gestación; Of: ratas obesas con 20 días de gestación.

Tabla 19. Frecuencia de anomalías viscerales en fetos de ratas controles y obesas

	Cf	Of
Fetos con anomalías viscerales (%)	12/84 (14,29) †	4/77 (5,19%)
Microftalmia unilateral (%)	1 (1,2)	0 (0,0)
Cardiomegalia (%)	1 (1,2)	0 (0,0)
Hernia diafragmática (%)	1 (1,2)	0 (0,0)
Gastroquisis (%)	0 (0,0)	2 (2,6)
Uréter acodado (%)	9 (10,7)†	1 (1,3)
Ausencia unilateral de glándula adrenal (%)	0 (0,0)	1 (1,3)

Se presenta el valor total y el porcentaje de las anomalías viscerales. Cf: ratas controles con 20 días de gestación; Of: ratas obesas con 20 días de gestación. †p < 0,05 comparado con grupo control (Prueba exacta de Fisher).

3.2.4 Placentas de ratas con 20 días de gestación

No hubo diferencias significativas en el peso de las placentas ni en el índice placentario entre el grupo de las obesas y el control. Se observó mayor daño oxidativo a proteínas (PAOP) en las placentas de las obesas. El resto de las determinaciones bioquímicas no mostraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 20).

Tabla 20. Variables determinadas en placentas de ratas controles y obesas

Variables	Cf	Of
Peso (g)	0,53 ±0,1	0,52 ±0,1
Índice placentario	0,15 ±0,0	0,16 ±0,0
GSH (mmol/mg de proteínas)	0,13 ±0,0	0,13 ±0,0
SOD (UAE/min/mg de proteínas)	7,2 ±3,2	5,0 ±1,6
CAT (KU/min/mg de proteínas)	0,08 ±0,0	0,09 ±0,0
Índice SOD/CAT	125,7 ±87,6	59,8 ±26,0
PFD (nmolMDA/mg ADN)	2,2 ±1,7	1,5 ±1,1
PAOP (µmol/mg de proteínas)	0,02 ±0,0	0,05 ±0,0*
MDA (µmol/mg de proteínas)	1,0 ±0,7	0,56 ±0,5

Se presenta el valor promedio ± la desviación estándar de cada variable. Cf: ratas controles con 20 días de gestación; Of: ratas obesas con 20 días de gestación.; GSH: glutatión reducido; SOD: superóxido dismutasa; CAT: catalasa; PFD: productos de la fragmentación de la 2-dexosirribosa; PAOP: productos avanzados de la oxidación de proteínas; MDA: malondialdehído. * Diferencia significativa comparado con grupo control; p < 0,05 (Prueba U de Mann-Whitney).

3.3 Resumen de los principales resultados

-Disminución significativa de la mortalidad con la aplicación de 5 dosis de GMS (4 mg/g de peso corporal) por vía subcutánea los días 2, 4, 6, 8 y 10 posteriores al nacimiento para inducir obesidad en ratas.

Ratas con 11,5 días de gestación:

-Las ratas obesas presentaron incremento significativo de los TAG.

-Disminución significativa en la concentración de GSH en las ratas obesas que tuvieron embriones malformados con respecto a ratas controles y obesas sin embriones malformados.

- Disminución significativa del índice de fertilidad, el número de cuerpos lúteos, de implantaciones y de embriones, así como aumento de las pérdidas preimplantación en las ratas obesas.

- Incremento significativo del porcentaje de embriones malformados y con retardo en el crecimiento, así como disminución de la longitud corporal y el número de somitas en la descendencia de las ratas obesas. Aumento de los niveles de PAOP en los embriones del grupo de obesas.

Ratas con 20 días de gestación:

- Incremento significativo de los niveles plasmáticos de nitratos y nitritos, de MDA (a nivel sistémico y en tejido adiposo), de la relación SOD/CAT en hígado y de los niveles de PAOP en la placenta. Disminución de la concentración de SOD en el tejido adiposo.

- Disminución significativa del índice de fertilidad, el número de cuerpos lúteos, de implantaciones y de fetos en las ratas obesas.

- Disminución significativa del peso y diámetro craneano anteroposterior de los fetos de las ratas obesas y aumento significativo del porcentaje de muertes fetales en este grupo experimental.

4. DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

Uno de los principales resultados de esta investigación fue lograr un modelo de obesidad y preñez que reproduce consecuencias para la descendencia. Las muertes neonatales ocurridas en el grupo al que se le administró GMS podría deberse a que esta sustancia es capaz de atravesar la BHE (que en período neonatal no está completamente desarrollada), provocando agotamiento de las reservas energéticas y muerte celular, con lo cual se afectan funciones vitales. Lo anterior coincide con lo reportado en la literatura^{102,135}.

Se plantea que con la absorción relativamente lenta del producto por vía subcutánea y la administración en días alternos pudiera aminorarse el efecto neurotóxico agudo del GMS¹⁰⁹. El esquema de administración seleccionado para inducir obesidad en ratas Wistar fue el que permitió el mayor éxito en cuanto a obtener animales obesos con menor manipulación de estos y disminución de la mortalidad (Tablas 5 y 6).

La disminución de la longitud corporal y de la ingesta alimenticia, así como el incremento de la grasa abdominal observado en las ratas obesas son características de este modelo⁴⁵. La reducida ganancia de peso en estas ratas pudiera guardar relación directa con la disminución de la ingesta alimenticia. El mecanismo por el cual desarrollan hipofagia estos animales no está bien esclarecido⁴⁵ (Tablas 7 y 8).

La hormona de crecimiento aumenta la longitud de los huesos largos al estimular la proliferación celular en las placas epifisarias del cartílago de estos huesos y su posterior diferenciación en tejido óseo. También incrementa el grosor de los huesos membranosos debido a su potente efecto estimulante sobre los osteoblastos. Esta

hormona activa al factor de crecimiento insulinoide 1 el cual estimula la síntesis de proteínas musculares y por consiguiente el desarrollo de la masa muscular^{140,141}.

La lesión hipotalámica se asocia a reducción en los niveles de hormona liberadora de hormona del crecimiento con la consiguiente disminución en los niveles de hormona del crecimiento. Como consecuencia de esto se produce acortamiento de los huesos, disminución de la masa muscular y aparece retardo en el crecimiento (disminución de la longitud corporal)⁴⁵. Los menores valores plasmáticos de creatinina (Tabla 9) encontrados en las ratas obesas con 20 días de gestación confirman la sarcopenia que desarrollan los mismos. La creatinina es obtenida a partir de la fosfocreatina, un compuesto de reserva energética muscular. La concentración de fosfocreatina es proporcional a la masa muscular¹⁴⁰.

Otro factor que pudiera estar influyendo en la disminución de la masa muscular es el incremento de glucocorticoides circulantes, lo cual es característico en las ratas obesas por GMS^{45, 142-144}. Los glucocorticoides estimulan el catabolismo de proteínas musculares a la vez que inhiben la síntesis de estas. Además inhiben el efecto de la hormona de crecimiento sobre el músculo^{140,141}.

La obesidad inducida por GMS constituye un modelo de obesidad visceral. La acumulación de grasa intra-abdominal (Tabla 7) pudiera deberse, en parte, al efecto pro-adipogénico por exceso de glucocorticoides circulantes en estas ratas. Los glucocorticoides inducen la expresión de factores de transcripción adipogénicos como PPAR γ ¹⁴². Este receptor nuclear promueve la diferenciación de los preadipocitos en adipocitos maduros en el tejido adiposo, con lo cual se incrementa el número de estas células. También induce la expresión de genes relacionados con la captación de ácidos grasos, la biosíntesis de ácidos grasos y de proteínas

de las vesículas lipídicas donde se almacenan los triacilgliceroles. Lo anterior favorece la lipogénesis y el aumento de las reservas grasas^{51,145}.

La exposición crónica a exceso de glucocorticoides estimula la lipogénesis, debido a sobreexpresión de la lipasa de lipoproteína, disminución de la actividad de la AMPK y de la expresión de proteína desacopladora 1 (UCP1)¹⁴⁵. Estos efectos metabólicos son mediados posiblemente por activación del receptor de mineralocorticoides¹⁴⁶.

La lipasa de lipoproteína degrada los TAG contenidos en las VLDL y quilomicrones en ácidos grasos y glicerol. Los ácidos grasos son captados por los adipocitos y re-esterificados al glicerol formándo los TAG dentro de estas células¹⁴¹. Por su parte la AMPK fosforila a la enzima reguladora de la biosíntesis de ácidos grasos la acetil coenzima A carboxilasa, bloqueando su polimerización e inactivándola. La inhibición de la AMPK favorece entonces la síntesis de ácidos grasos y de TAG^{141,145}.

La disminución de la expresión de la UCP1 reduce la pérdida de energía en forma de calor e incrementa la deposición grasa¹⁴⁵. La UCP1 disipa el gradiente de protones generado durante el transporte de electrones con lo cual disminuye la producción de ATP. Al no desacoplarse el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa se favorece la producción de energía metabólicamente útil en forma de ATP. Cuando se incrementa la razón ATP/ADP se bloquea la activación de la AMPK y por consiguiente se activa la biosíntesis de ácidos grasos y la lipogénesis¹⁴¹.

Por otra parte, las ratas con obesidad inducida por GMS experimentan fallas en el mecanismo de termogénesis estimulada por activación simpática a nivel del tejido

adiposo pardo, por lo que tienen menor gasto energético y menor tasa metabólica basal. Todo esto favorece la deposición grasa¹⁴⁷.

Hay evidencias de disminución de la expresión del receptor de la leptina a nivel de la glándula adrenal¹⁴³, así como del incremento en la concentración plasmática de leptina en ratas obesas por GMS^{95,98,143,148}. Lo anterior conduce a resistencia a la leptina. Normalmente, la leptina inhibe la secreción de glucocorticoides estimulada por la hormona adrenocorticotropa en las glándulas adrenales. Por consiguiente, ante la resistencia adrenal a la leptina aumentan los niveles de glucocorticoides¹⁴³.

En la obesidad humana, se ha constatado incremento de la expresión y de la actividad de la enzima 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa 1 (11 β -HSD1) en el tejido adiposo subcutáneo y visceral. Esta enzima convierte la cortisona en cortisol (forma activa) y genera ~ 40% de la producción diaria de glucocorticoides. El aumento de la actividad de 11 β -HSD1 conduce a elevar los niveles de cortisol y contribuye a las complicaciones metabólicas de la obesidad¹⁴⁹.

El aumento de los TAG fue constatado en las ratas obesas con 11,5 días de gestación (Tabla 9). Esto coincide con lo reportado en un estudio con ratas obesas gestadas¹⁴⁸. El incremento de los TAG en las ratas obesas con 11,5 días de gestación no es consecuencia de las adaptaciones metabólicas de la gestación sino de la obesidad. Así lo demuestra la correlación positiva encontrada entre el índice de Lee y los TAG plasmáticos. Este período equivale al primer trimestre del embarazo en humanos (fase anabólica) donde se estimula la lipogénesis, o sea, se acumulan reservas grasas, no se movilizan^{12,78}.

Tanto en los controles como en las ratas obesas con 20 días de gestación la concentración de TAG se elevó considerablemente (Tabla 9), lo que sí es debido

posiblemente a modificaciones propias de la preñez (fase catabólica)^{12,78,79}. La degradación de las reservas grasas es característico de esta fase de la gestación^{12,78,79}.

Ha sido demostrado el incremento de los AGNE en la circulación de ratas con obesidad inducida por GMS^{96,97,99,100}. La llegada masiva de AGNE al hígado, como consecuencia de la actividad lipolítica incrementada en los adipocitos hipertrofiados de las ratas obesas por GMS, induce estrés del RE⁹⁷.

El estrés del RE activa a la proteína de unión al motivo X (XBP1) la cual estimula la expresión de la proteína disulfuro isomerasa (PDI). Esta proteína (PDI) forma con la proteína del RE que transfiere triacilglicerol (MTP) un heterodímero que empaqueta triacilglicerol junto a la apolipoproteína B formando las VLDL, una lipoproteína rica en TAG endógenos. Como consecuencia de la activación del eje XBP1/PDI/MTP se incrementa la síntesis y exportación de VLDL hacia la circulación⁹⁷. Lo anterior conduce a incremento de los TAG en el plasma, lo cual también contribuye al acúmulo de grasa visceral. El aumento de los TAG constituye, a su vez, un relevante factor inductor de estrés del RE en el hepatocito⁹⁷.

Los índices HOMA y TyG no mostraron diferencias entre los grupos por lo que no se constató la existencia de resistencia a la insulina en las ratas obesas (Tabla 9). Ello podría deberse a que la aparición de esta alteración metabólica requiere de mayor tiempo de evolución de la obesidad. Este argumento tiene su basamento en que en un estudio hecho con el modelo utilizado en esta investigación las ratas obesas no gestadas con 180 días de vida (90 días de evolución de la obesidad) mostraron incremento significativo de los índices antes mencionados¹⁵⁰.

Las ratas obesas con 11,5 días de gestación no mostraron alteración de la capacidad antioxidante ni daño oxidativo a biomoléculas a nivel sistémico ni tisular (Tablas 10 y 11). Sin embargo, las ratas obesas con 20 días de gestación presentaron mayor concentración de nitratos/nitritos y mayor daño oxidativo a lípidos a nivel sistémico y en tejido adiposo. También presentaron aumento del índice SOD/CAT en hígado lo cual indica la existencia de ambiente prooxidante, así como disminución de la actividad de SOD en el tejido adiposo (Tabla 11). Además, con respecto a las ratas con 11,5 días de gestación se observó al nivel del hepatocito incremento en los niveles de MDA.

Los niveles elevados de nitratos y nitritos indican producción incrementada de óxido nítrico, lo cual se acompaña de aumento en la generación de peroxinitrito, un potente oxidante, que rápidamente se descompone en radical hidroxilo, nitratos y nitritos. El óxido nítrico reacciona espontáneamente con el radical superóxido para formar peroxinitrito¹⁵¹.

Los resultados expuestos arriba sugieren predominio de condiciones prooxidantes en las ratas obesas con 20 días de gestación. Lo anterior podría estar relacionado con incremento de los AGNE en la circulación, los cuales estimulan la producción de ERO en la mitocondria y en fuentes extra-mitocondriales (activación de NADPH oxidasa)^{3,6,74,75}. El estado prooxidante a nivel del hepatocito de las ratas obesas podría conducir a disfunción hepática⁹⁵.

La albúmina es la proteína más abundante y estable del plasma (representa más del 50 % del total de proteínas plasmáticas). La síntesis de esta proteína ocurre en el hígado. Entre sus funciones se encuentra la transportación de sustancias endógenas como los AGNE¹⁵². El incremento de la albúmina en el grupo de las

obesas con 11,5 días de gestación (Tabla 9) pudiera estar en relación con el aumento de AGNE en la circulación de estos animales.

La disminución de la albúmina plasmática en ratas obesas con 20 días de gestación (Tabla 9) podría constituir un signo de disfunción hepática. El ambiente prooxidante, la acumulación ectópica de lípidos y estrés del RE en el hígado de estos animales pudieran causar alteración en la función del hepatocito⁹⁷. Seiva y colaboradores⁹⁵ encontraron disminución de las proteínas plasmáticas y elevados valores de transaminasas [aspartato aminotransferasa y ALAT] en suero de ratas con obesidad inducida por GMS. En otra investigación constataron esteatosis hepática y concentraciones incrementadas de transaminasas en el suero de ratas con obesidad inducida por GMS⁹⁷.

El incremento significativo de los niveles de colesterol, TAG, nitratos y nitritos y de los índices TyG y HOMA-IR, junto a la disminución de la glucosa en sangre en todos los grupos de 20 días de gestación con respecto a los grupos de 11,5 días de gestación, sugieren cambios metabólicos propios de la gestación. El incremento en la concentración de GSH, SOD, CAT, MDA y PAOP en el tejido adiposo de todos los grupos de 20 días de gestación con respecto a los grupos de 11,5 días de gestación son atribuibles a las adaptaciones metabólicas durante la preñez⁷⁸⁻⁸⁰.

Las ratas obesas tuvieron menor índice de fertilidad. Campos y colaboradores¹³⁵ también encontraron reducción de la fertilidad en ratas con obesidad inducida por GMS. El número de cuerpos lúteos disminuyó en las ratas obesas, lo que evidencia una reducción en el número de ovocitos liberados durante el proceso de ovulación. Gaspar y colaboradores¹⁵³ encontraron disminución del número de ovocitos liberados al momento de la ovulación (fase estro) en ratas obesas por GMS.

Además, este estudio mostró un desarrollo folicular alterado en los ovarios de ratas con obesidad inducida por GMS, dado por incremento del número de folículos atrésicos, de quistes foliculares y de folículos primordiales¹⁵³ (Tabla 12).

En esta investigación hubo menor cantidad de ovocitos maduros fertilizados y de embriones implantados con la consiguiente reducción en la descendencia de las ratas obesas. Un grupo de investigadores encontró disminución de la descendencia en un modelo de obesidad inducida por GMS por vía bucal en un estudio previo a este¹⁴⁸ (Tabla 12).

El defecto en la fertilidad constatado en este estudio (Tabla 12) en ratas con obesidad inducida por GMS se origina en el sistema nervioso central. La inyección neonatal por GMS elimina neuronas que expresan neurokinina B/kisspeptina/dinorfina en el núcleo arqueado, las cuales regulan la secreción pulsátil de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) al nivel de la eminencia media hipotalámica¹⁵⁴. La pérdida de la actividad pulsátil de GnRH provoca disminución de la síntesis y secreción de gonadotropinas hipofisarias [hormona luteinizante (LH) y hormona folículo-estimulante], especialmente de LH. Lo anterior conduce a disminución en la síntesis de estrógenos y progesterona, menor producción de ovocitos en los ovarios y alteraciones en el proceso de ovulación^{141,148,154}.

La leptina a nivel del hipotálamo constituye una señal necesaria para la expresión y liberación del neuropéptido kisspeptina, el cual regula la secreción pulsátil de GnRH. Se han detectado en períodos de inanición o restricción calórica bajos niveles de ARN mensajero de leptina y kisspeptina. Es característico que en humanos obesos exista resistencia a la leptina. Como consecuencia puede

observarse alteración de la función del eje reproductivo (hipotálamo-hipofisis-gonadal) debido a disminución en la síntesis y secreción de kisspeptina, GnRH y LH respectivamente^{155,156}.

La resistencia a la insulina en humanos trae como consecuencia disminución en la producción hepática de la globulina fijadora de hormonas esteroideas. La reducción en los niveles plasmáticos de esta proteína conduce a hiperandrogenemia, incremento de la aromatización periférica de andrógenos en el tejido adiposo y a la consiguiente elevación de estrógenos libres circulantes. El incremento de los estrógenos, mediante perpetuación del mecanismo de retroacción negativa, resulta en disminución de GnRH hipotalámica y de las gonadotropinas hipofisarias¹⁵⁷.

La disfunción hormonal podría causar falla en la implantación del embrión, lo cual explicaría el incremento en las pérdidas preimplantación encontrado en las ratas obesas de 11,5 días (Tabla 12). Durante la fase luteínica (Diestro) se produce incremento gradual en las concentraciones de progesterona producida por el cuerpo lúteo. Más tarde hay un aumento en los estrógenos. Estas hormonas inducen cambios sobre el endometrio que posibilitan la implantación y mantenimiento del embrión¹⁵⁸. La ocurrencia de apoptosis de una masa grande de células del blastocisto también pudiera provocar falla en la implantación o la pérdida total del embrión¹⁵⁹ debido posiblemente a un ambiente hiperlipémico⁷⁴. En las ratas obesas con 20 días de gestación, a pesar de mostrar una disminución en el número de cuerpos lúteos, los que se desarrollaron fueron suficientes para garantizar la implantación embrionaria y que la disfunción hormonal haya sido menos severa en estos animales.

El posible incremento de los AGNE en la circulación de las ratas obesas^{96,97,99,100} también podría contribuir a alteración en la función reproductiva. Ha sido demostrado que el aumento de los AGNE modifica la composición del fluido folicular lo que provoca alteración del desarrollo de los folículo y de la maduración del ovocito y del desarrollo del embrión en sus primeros estadios de la etapa prenatal¹⁶⁰.

Los embriones de las ratas obesas presentaron menor longitud corporal, número de somitas y más bajo contenido de ADN y proteínas (Figura 21). Además la proporción de embriones retrasados fue mayor en el grupo de las obesas (Tabla 13). Los fetos de las ratas obesas tuvieron menor peso y diámetro craneano anteroposterior (Tabla 16). Otros investigadores han encontrado resultados similares con otros modelos de obesidad^{26,27}. El crecimiento intrauterino en mamíferos depende del suministro de nutrientes desde la madre hacia el producto de la concepción¹⁶¹, por lo que la disminución en el crecimiento de la descendencia en las ratas obesas podría deberse, en parte, a la disminución de la ingesta alimenticia y energética que muestran estos animales. Lo anterior lleva a reducción en la ganancia de peso durante la gestación. Se ha demostrado que una mayor ingesta calórica ocasiona mayor ganancia de peso¹⁶¹. Los nutrientes consumidos por las obesas podrían ser dirigidos a sustentar el metabolismo materno más que el crecimiento fetal lo cual también limita la ganancia de peso gestacional¹⁶².

Otro aspecto que pudiera incidir en el menor crecimiento de la descendencia de las madres obesas es la ocurrencia de apoptosis de un número limitado de células del blastocito lo cual produce retardo del crecimiento¹⁵⁹. La hiperlipemia materna pudiera inducir la apoptosis⁷⁴.

Por otro lado, el exceso de glucocorticoides maternos, lo cual es característico de este modelo, reduce el suministro de aminoácidos y glucosa hacia el embrión o feto. Los glucocorticoides incrementan la expresión de la proteína 1 regulada por el desarrollo y la respuesta al daño al ADN (Redd1) al nivel placentario, la cual disminuye la expresión de transportadores de nutrientes (glucosa o aminoácidos) o pudiera bloquear el traslado de transportadores de nutrientes hacia la membrana plasmática. En el caso de los transportadores de aminoácidos (Sistema A que transporta aminoácidos neutros), Redd1 suprime la señalización mediada por la vía de la proteína blanco de la rapamicina (mTOR)-PKB e inhibe la síntesis de los mismos^{161,163}. La exposición a exceso de glucocorticoides también conduce a desarrollo anormal del tejido trofoblástico y altera la función placentaria lo que puede contribuir a disminuir el crecimiento del producto¹⁶⁴.

Los embriones retrasados presentaron longitud corporal, número de somitas, contenido de ADN y proteínas superiores a los malformados, pero inferiores a los embriones normales (Figura 4). Este resultado confirma lo acertado de la clasificación de los embriones empleada en esta investigación. En investigaciones con ratas diabéticas, algunos autores incluían a los embriones retrasados dentro del grupo de los malformados^{21,165-169}.

La presencia de malformaciones en los embriones se asoció a menor talla y número de somitas (Tabla 14). El desarrollo embrionario es un proceso de crecimiento y de aumento de la complejidad de las estructuras y funciones. La complejidad se consigue durante el proceso de morfogénesis y de la diferenciación celular. En el desarrollo temprano el encéfalo embrionario crece más rápido que las porciones

caudales y constituye los dos tercios craneales del embrión. Una anomalía en esta región retrasará el crecimiento y desarrollo del concepto¹⁷⁰.

El porcentaje de embriones retrasados y malformados fue significativamente superior en la descendencia de ratas obesas, predominando en los últimos los DTN (Tablas 13 y 15). Por otro lado, el porcentaje de muertes fetales fue mayor en las camadas de las obesas (Tabla 12). Estos hallazgos coinciden con lo que se ha descrito en humanos^{8,11,15-17,19}. Se conoce que existe fuerte asociación entre las anomalías congénitas y el riesgo de muerte fetal^{8,11}. Estos resultados demostrarían el efecto teratogénico de la obesidad materna.

En la descendencia de las ratas obesas con 20 días de preñez no se encontraron fetos con DTN ni con malformaciones cardíacas que han sido reportados como defectos frecuentes asociados a la obesidad materna¹⁵⁻¹⁹. El análisis de las dos etapas del desarrollo prenatal hace suponer que los embriones con DTN no sobreviven. Ha sido demostrado que los embriones malformados mueren y son completamente reabsorbidos hacia el día 12,5 de la gestación⁶⁶.

Con relación a las malformaciones cardíacas pudieran ser la causa del incremento de las muertes fetales en la descendencia de las obesas. Se conoce que cuando ocurre migración defectuosa de células de las crestas neurales hacia el corazón, estos animales mueren hacia el día 16,5 de la gestación⁸³. Otra posible explicación pudiera ser que la magnitud de la inhibición de la expresión de un gen determinado fuera suficiente para inducir DTN pero no las malformaciones cardíacas⁸⁵.

El modelo de obesidad empleado en esta investigación es obtenido mediante la administración de una sustancia química: el GMS. Este compuesto es inyectado en período neonatal y se elimina rápidamente de la circulación. Tras la administración

subcutánea del GMS en roedores se produce un pico de concentración (40mM) de glutamato en el plasma a los 15 minutos y a las tres horas se constatan niveles cercanos a los basales (por debajo de 1mM)^{171,172}. En la adultez, al momento de la concepción, no hay exposición a dicha sustancia. Tampoco se tiene referencia de que el GMS induzca malformaciones congénitas, por lo cual, estas serían consecuencia de la obesidad y no por la administración del GMS.

La causa del riesgo incrementado de malformaciones en la descendencia de madres obesas no está aún dilucidado. Las ratas obesas con embriones malformados presentaron menores niveles de GSH (Figura 2) y se encontró correlación entre la disminución en los niveles de GSH maternos y la presencia de malformaciones. Además se observó mayor concentración de PAOP en los embriones de las ratas obesas, especialmente en los alterados (retrasados y malformados) (Figura 5). Estos hallazgos sugieren que el estrés oxidativo, probablemente inducido por un ambiente hiperlipémico⁷⁴, podría constituir un factor patogénico subyacente en la aparición de malformaciones congénitas.

En un trabajo realizado por nuestro grupo con mujeres sobrepeso y obesas, se encontró que las mujeres con hijos malformados presentaron concentraciones disminuidas de GSH¹⁷³. En este estudio se ha obtenido un resultado similar. El GSH es el principal antioxidante endógeno y es esencial para la eliminación de ERO⁶⁵. El GSH materno pudiera atravesar la placenta, contribuyendo a la eliminación de ERO a nivel del embrión o regular vías de señalización específicas. Jauniaux E y colaboradores¹⁷⁴ demostraron presencia de GSH en el fluido celómico (considerado un ultrafiltrado del plasma materno) pero no en el fluido amniótico durante el primer trimestre de la gestación humana. Lo anterior indica que

probablemente esta molécula antioxidante actúe a nivel de la interfase materno-fetal.

El GSH regula la actividad de factores de transcripción sensibles al estado redox, como NF- κ B y la proteína activadora 1, activándose vías de señalización específicas relacionadas con la proliferación y diferenciación celulares durante la organogénesis. Durante este período se requiere una elevada razón glutatió n reducido/glutatió n oxidado⁶⁶. La disminución de los niveles de GSH conduciría a alteración en la organogénesis y aparición de malformaciones.

La disminución de los niveles de GSH se correlaciona con bajos niveles de histona H3 glutationilada, lo que conduce a menor expresión génica. La glutationilación de la histona H3 desestabiliza la estructura del nucleosoma, haciendo a la cromatina más laxa lo que favorece la transcripción génica. Dentro de los genes afectados se encuentran aquellos cuyos productos participan en el proceso de replicación del ADN. La concentración reducida de GSH disminuye la síntesis de ADN, lo que pudiera influir negativamente sobre el desarrollo embrionario¹⁷⁵.

La hipertriacilglicerolemia constituye la alteración metabólica principal en ratas con obesidad inducida por GMS⁹⁷. Esta investigación lo ha corroborado. Este podría ser el posible sustrato metabólico causante de la teratogénesis inducida por la obesidad. Se ha encontrado, en humanos, correlación positiva entre niveles incrementados de TAG y la aparición de DTN¹⁷⁶. Otra investigación mostró correlación entre los niveles incrementados de TAG y mayor riesgo de malformaciones congénitas mayores no sindrómicas, incluyendo anomalías cardiovasculares¹⁷⁷. Un posible mecanismo bioquímico para la teratogénesis inducida por la obesidad se propone a continuación.

Los niveles de AGNE en el embrión son dependientes de las concentraciones de estos en la circulación materna. La lipasa de lipoproteína placentaria genera estos AGNE a partir de los TAG contenidos en las lipoproteínas maternas^{13,176}. Se ha encontrado incremento en la expresión de proteínas transportadoras de ácidos grasos al nivel de la placenta en modelos animales de obesidad¹⁷⁸. El incremento de la concentración de TAG en la madre resulta en aumento del flujo de AGNE hacia el embrión^{13,176}.

Los DTN y malformaciones cardíacas (defectos septales) están asociados a la apoptosis de una masa crítica de células progenitoras (células de las crestas neurales) durante la formación del órgano dañado. La insuficiente expresión de genes que regulan la viabilidad de estas células progenitoras es la causa de esta muerte celular programada^{44,179}. Los AGNE, especialmente los poliinsaturados de cadena larga, y sus metabolitos derivados (ej: ceramidas, DAG) inducen apoptosis en varios tipos celulares⁷⁴.

El efecto pro-apoptótico de los AGNE o sus derivados en embriones de ratas obesas pudiera estar mediado por incremento en la generación de ERO o directamente por la activación de JNK o isoformas de la PKC (α , $\beta 2$, δ)^{3,5-7,74,75,176}. Se conoce que la activación de estas seril/treonil proteínas kinasas estimula vías de señalización que conducen a la apoptosis de células de las crestas neurales y a la aparición de DTN, defectos cardíacos o ambos^{44,179}.

Las ERO inhiben la expresión de genes que previenen la apoptosis de células de las crestas neurales, como PAX 3⁸⁶. Existe un número crítico de células cardíacas de las crestas neurales y de células progenitoras del neuroepitelio. Si en las células cardíacas la inhibición de PAX3 está por debajo del nivel crítico de viabilidad no

ocurrirán malformaciones congénitas de este sistema, pero sí un defecto de cierre del tubo neural¹⁸⁵. Lo anterior pudiera explicar por qué se han detectados DTN y no malformaciones cardíacas en este estudio.

El ácido araquidónico es un ácido poliinsaturado de cadena larga. Es obtenido a partir de los fosfolípidos de las membranas celulares por acción de la fosfolipasa A₂. Este ácido graso es convertido en la prostaglandina E₂ vía ciclooxigenasa 2. La prostaglandina E₂ tiene efecto citoprotector. En presencia de ERO el ácido araquidónico es transformado en isoprostanos semejantes a la prostaglandina E₂, los cuales son citotóxicos. Esto ocurre por una vía no mediada por la ciclooxigenasa 2. En embriones malformados se ha encontrado disminución de la actividad y expresión de la ciclooxigenasa 2 con reducción de los niveles de prostaglandina E₂ e incremento de los isoprostanos semejantes a la prostaglandina E₂¹⁷⁹.

La obesidad es un estado inflamatorio crónico de bajo grado^{60,62}. Las citocinas maternas pueden atravesar la placenta e inducir la formación de citocinas en el embrión. El predominio de citocinas proinflamatorias en el producto de la concepción puede alterar la organogénesis, especialmente a nivel del sistema nervioso central. Las citocinas proinflamatorias incrementan la producción de ERO, las cuales causan malformaciones congénitas¹⁸⁰. Dos estudios mostraron incremento de la expresión de citocinas proinflamatorias en etapa adulta de roedores tratados con GMS neonatalmente^{181,182}. Se ha constatado aumento de los niveles séricos de citocinas proinflamatorias durante los tres trimestres de la gestación en mujeres obesas¹⁸³.

Otra posible explicación al incremento del porcentaje de embriones malformados en las ratas obesas pudiera ser que los requerimientos nutricionales de las obesas

sean diferentes a los de las controles. En las primeras pudiera haber déficit de micronutrientes. La deficiencia de Zn o folatos se ha relacionado con la aparición de malformaciones del sistema nervioso central o del sistema cardiovascular^{184,185}.

Un estudio mostró que la suplementación con Zn durante la gestación disminuyó el estrés oxidativo y la apoptosis de células cardíacas en embriones de ratas diabéticas. El Zn actúa como cofactor de algunas enzimas antioxidantes como SOD. Este oligoelemento pudiera inducir la síntesis de metalotioneína, proteína antioxidante que contribuye a eliminar ERO. Además, se ha encontrado que el Zn protege de la oxidación a grupos sulfhidrilos, disminuye los niveles de hierro y bloquea las reacciones catalizadas por el hierro que generan radicales libres¹⁸⁶.

Se ha encontrado disminución de los niveles sanguíneos de folatos en mujeres gestadas obesas, incluso a pesar de haber sido suplementadas durante el embarazo^{42,187}. El ácido fólico actúa como cofactor en la síntesis de nucleótidos (precursores de los ácidos nucleicos)^{185,188}. La disfunción en el metabolismo del ácido fólico induce cambios epigenéticos (modificación en la remodelación de la cromatina, hipometilación de genes) produciéndose alteración en la expresión de genes durante el desarrollo^{185,188}. Ha sido demostrado la prevención o disminución de los DTN con la suplementación con ácido fólico tanto en humanos como en modelos animales^{167,168,189}.

Las concentraciones reducidas de selenio han sido relacionadas con la aparición de DTN. La deficiencia de selenio afecta la capacidad antioxidante ya que este micronutriente interviene en la síntesis de enzimas como la glutatión peroxidasa y la tiorredoxina reductasa¹⁹⁰.

A pesar de los hallazgos encontrados en este trabajo, se necesita de investigaciones posteriores que aporten más información para esclarecer el posible mecanismo de la teratogénesis asociada a la obesidad, y ayuden a entender la implicación del estrés oxidativo.

Los porcentajes de anomalías esqueléticas y viscerales del grupo control están dentro del rango reportado en la literatura en ratas Wistar^{139,191-194} (Tablas 17 y 19). El período fetal en las ratas es muy corto. Posnatalmente ocurre una remodelación de los sistemas de órganos, por lo que hay anomalías encontradas en los fetos que desaparecen posteriormente^{118,195}. Estas son consideradas variaciones, o sea, cambios estructurales que ocurren en la población bajo investigación que probablemente no afecten la supervivencia de la especie^{36,118,196}. Todavía existen anomalías detectadas en fetos a término (en ratas con 20 o 21 días de preñez) que no se conoce las consecuencias posnatales de su presencia pues no han sido sistemáticamente estudiadas^{118,195}.

El sistema esquelético no escapa al proceso de remodelación. La osificación incompleta de los huesos del cráneo, específicamente el supraoccipital e interparietal fueron las anomalías esqueléticas más frecuentes en los controles en esta investigación (Tabla 17). Son resultados de un retardo en el proceso de osificación y desaparecen después del nacimiento¹⁹⁵.

Se ha demostrado que las costillas arqueadas, una de las anomalías observada en los controles en esta investigación, se deben a un retardo en la osificación o mineralización del hueso (Tabla 18). La fuerza ejercida por la contracción de los músculos en desarrollo sobre las costillas inmaduras provoca alteración de su forma. Esta anomalía esquelética no está presente en las crías al momento del

destete. En los huesos del cráneo debido a la escasa musculatura que los rodea, el retardo en la osificación del hueso no lo deforma¹⁹⁵. Las anomalías de los centros vertebrales (Tabla 18) también desaparecen posnatalmente, pero más tardíamente que las costillas arqueadas¹⁹⁵.

El uréter acodado o en forma de “S” fue la anomalía visceral más frecuente en el grupo control (Tabla 19). Las anomalías del tracto genitourinario son frecuentes en las ratas Wistar controles y son variaciones transitorias. Acorde con la literatura, aproximadamente un 20 % de los fetos de ratas Wistar controles presentan este tipo de anomalía visceral¹³⁹. Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado.

El proceso de remodelación de los sistemas de órganos pudiera haberse iniciado desde la etapa fetal en la descendencia de las ratas obesas, lo cual explicaría la menor frecuencia de anomalías esqueléticas y viscerales detectadas en los fetos de las ratas con obesidad inducida por GMS (Tablas 17, 18 y 19). Este efecto pudiera deberse a incremento de los glucocorticoides maternos, los que se sabe son determinantes para la maduración de los órganos fetales^{197,198}.

Normalmente durante la etapa fetal se incrementan considerablemente los niveles de cortisol en el feto. Un tercio de los glucocorticoides en sangre fetal son obtenidos por transferencia placentaria a partir de la madre^{197,198}. La sobreexposición a glucocorticoides de los fetos de las ratas obesas durante la preñez aceleraría el proceso de remodelación y maduración de los sistemas de órganos de estos fetos.

Los fenotipos placentarios asociados a la obesidad, que incluyen el tamaño, la forma, flujo sanguíneo, transporte de oxígeno y nutrientes, no han sido suficientemente estudiados^{162,199}. Por un lado la obesidad materna puede incrementar el peso fetal y placentario relacionado posiblemente con un área de

superficie de intercambio incrementada, así como con un aumento en la expresión y actividad de transportadores de glucosa y aminoácidos. Lo anterior se asocia a macrosomía fetal^{162,199}.

Se han encontrado placentas grandes y peso fetal reducido con disminución de la eficiencia placentaria en la obesidad (fenotipo del crecimiento intrauterino retardado). En este caso el área de superficie de intercambio está reducida con aumento del espesor^{162,199}. La no modificación del peso fetal y de la placenta también se ha observado en la obesidad, constatándose incluso disminución de la expresión de transportadores de nutrientes (glucosa, aminoácidos) placentarios¹⁹⁹.

Ha sido demostrado que el exceso de glucocorticoides maternos reduce la densidad de vasos sanguíneos placentarios y como resultado el peso de las placentas es menor¹⁶¹. En este modelo de obesidad pudiera además producirse acumulación de lípidos en la placenta que incrementaría el peso de esta. En un estudio realizado con placentas de mujeres obesas se constató incremento en el contenido de lípidos²⁰⁰. La consecuencia de que hayan ocurrido ambos eventos pudiera explicar el que no se hayan encontrado diferencias con relación al peso e índice placentario entre obesas y controles (Tabla 20). Esto hace evidente la importancia de los estudios microscópicos.

Las placentas de ratas obesas mostraron mayores niveles de PAOP (Tabla 20). En la obesidad se incrementa la captación de AGNE por la placenta, los que estimulan la producción de anión superóxido. A nivel de la placenta se produce óxido nítrico, el cual contribuye al desarrollo placentario, a la angiogénesis y la vasodilatación a niveles normales. El óxido nítrico en combinación con el exceso de anión superóxido generaría peroxinitrito, produciéndose daño oxidativo a proteínas

placentarias²⁰¹. Algunos estudios realizados con placentas de mujeres obesas han constatado estrés oxidativo a este nivel^{41,200,202}. El daño oxidativo a proteínas pudiera también contribuir a una posible disminución de la actividad de transportadores de glucosa y aminoácidos en este modelo de obesidad.

Se plantea que el estrés oxidativo materno y placentario inducido por la obesidad pudiera producir cambios epigenéticos. Estas modificaciones epigenéticas pudieran estar relacionadas con la programación intrauterina de enfermedades de aparición en la adultez como la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2²⁰¹. Un estudio mostró que más del 90 % de la descendencia de ratas inyectadas neonatalmente con GMS desarrollaron obesidad cuando son adultos¹³⁵.

Por otra parte el estrés oxidativo constatado en las ratas obesas con 20 días de gestación (Tablas 10 y 11) y en sus placentas (Tabla 20) pudiera traer como complicación una hipertensión gestacional. Se conoce que este trastorno es más frecuente en madres obesas que en las de peso adecuado⁹. El estrés oxidativo provocaría disfunción endotelial, característica que subyace en uno de los trastornos hipertensivos más frecuentes en la gestación: la preeclampsia^{203,204}. A esto se suma que la exposición a los glucocorticoides predispone a la preeclampsia. Los glucocorticoides inhiben la proliferación, migración e invasión trofoblástica y la transición de epitelio a mesénquima con lo cual no ocurre una remodelación adecuada de las arterias espirales, evento que subyace en la patogénesis de la preeclampsia¹⁶⁴. La reducción de los niveles de albúmina plasmática en las ratas obesas del período fetal también pudiera indicar la presencia de preeclampsia²⁰⁵. Este modelo de obesidad pudiera reproducir esta complicación lo cual podría explorarse en futuras investigaciones.

Como puede deducirse de todo lo anterior la obesidad es un fenómeno complejo, determinado por muchos factores conocidos y posiblemente otros que aún no se conocen. Ésta investigación hace una contribución al conocimiento de este problema y plantea nuevas preguntas cuya solución llevará a un mayor grado de conocimiento sobre este importante problema de salud del siglo XXI.

CONCLUSIONES

1. El esquema de administración del glutamato monosódico seleccionado permitió la obtención de forma eficiente de animales con la condición objeto de estudio: la obesidad.
2. La obesidad pregestacional con acúmulo de grasa visceral alteró el metabolismo lipídico y generó estrés oxidativo en las ratas gestadas y sus placentas.
3. La presencia de anomalías congénitas en los embriones de ratas obesas se asoció a deterioro de la capacidad antioxidante celular materna, lo cual sugiere que señales relacionadas con el estado redox celular estén implicadas en la génesis de las malformaciones.
4. La obesidad inducida por glutamato monosódico influyó negativamente la capacidad reproductora de las ratas, lo que pudiera deberse al efecto combinado de la lesión hipotalámica inducida por el glutamato monosódico y las alteraciones metabólicas propias de la obesidad.
5. La obesidad pregestacional ejerció un efecto perjudicial sobre el desarrollo prenatal de la descendencia de ratas con obesidad inducida por glutamato monosódico.

RECOMENDACIONES

1. Emplear el modelo de obesidad inducida por glutamato monosódico en ratas en la evaluación de estrategias terapéuticas encaminadas a prevenir complicaciones asociadas a modificaciones en el ambiente redox como consecuencia de la obesidad pregestacional.
2. Aplicar la metodología para la evaluación del desarrollo embrionario, fetal y placentario utilizada en este trabajo en futuras investigaciones con ratas Wistar gestadas.
3. Profundizar en el estudio de la placenta con este modelo de obesidad.
4. Realizar estudios bioquímicos y estructurales en embriones cultivados en medio hiperlipémico, lo cual contribuirá a esclarecer la causa de las malformaciones inducidas por la obesidad y el papel del estrés oxidativo.
5. Determinar marcadores inflamatorios, cortisol, ácidos grasos y oligoelementos en la circulación materna, del embrión y el feto para evaluar la contribución de estos a la aparición de malformaciones congénitas en la obesidad pregestacional y a otras complicaciones en la descendencia.
6. Determinar gonadotropinas en sangre materna después de la aplicación del GMS y durante la gestación para dilucidar si las fallas reproductoras son debidas a un efecto de la obesidad o a daños causados por el GMS en las células hipotalámicas productoras de hormona liberadora de gonadotropinas.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Publicaciones relacionadas con el tema de la tesis

1. **Suárez-Román G**, Perera-Calderín A, Clapés-Hernández S, Fernández-Romero T, Egaña-Morales E. Estandarización de un modelo para inducir obesidad en ratas. Medisur [revista en Internet]. 2013 [citado 2013 Nov 21]; 11(5): [aprox. 4 p.]. Disponible en: <http://medisur.sld.cu/index.php/medisur/article/view/2486> ISSN 1727-897X
2. Rodríguez VM, Romero TF, **Román GS**, López HD, Pérez MS, García AC et al. Técnica para la obtención de embriones de 11,5 días en ratas gestantes diabéticas u obesas para el estudio de malformaciones congénitas. Rev FESAHANCCAL 2015; 1 (1): 54-58. disponible en: http://issuu.com/fesahanccal/docs/revista_fesahanccal
3. **Suárez-Román G**, Fernández-Romero T, Perera-Calderín AJ, Rodríguez-Sosa VM, Arranz C, Hernández SC. Pregestational Obesity-Induced Embryopathy. Reprod Sci. 2016 Sep; 23 (9): 1250-1257. DOI:10.1177/1933719116635279.

Publicaciones relacionadas con la línea de investigación del departamento Bioquímica, ICBP “Victoria de Girón”: Diabetes/ Obesidad, estrés oxidativo y gestación

1. Fernández Romero T, Clapés Hernández S, **Suárez Román G**, Uriarte Mulén O, Rodríguez Sosa VM, Herrera Álvarez M, et al. Efecto de la vitamina E en ratas diabéticas y sus fetos. Trabajo completo 2245 en “Memorias Cuba Salud 2012, Convención Internacional de Salud Pública “Por la salud y el bienestar de todos”, del 3-7 de diciembre de 2012. FRATEROS 2012; p: 4340-4346. ISBN 978-959-212-811-8
2. Fernández Romero T, Clapés Hernández S, **Suárez Román G**, Antiguas Pendás A, Uriarte Mulén O, Rodríguez Sosa VM, et al. Marcadores de estado metabólico, estrés oxidativo e inflamación en ratas diabéticas tratadas con vitamina E. Trabajo completo 2247 en “Memorias Cuba Salud 2012, Convención Internacional de Salud Pública “Por la salud y el bienestar de todos”, del 3-7 de diciembre de 2012. FRATEROS 2012; p: 4630-36. ISBN 978-959-212-811-8
3. Clapés Hernández S, Rojo Domínguez D, **Suárez Román G**, Fernández Romero T, Rodríguez López O, Pérez Hernández C, et al. Marcadores de estrés oxidativo en gestantes con adiposidad y su relación con la salud de los recién nacidos. Trabajo completo 2238 en “Memorias Cuba Salud 2012, Convención Internacional de Salud Pública “Por la salud y el bienestar de todos”, del 3-7 de diciembre de 2012. FRATEROS 2012; p: 4637-48. ISBN 978-959-212-811-8
4. Clapés Hernández S, Fernández Romero T, **Suárez Román G**. *Oxidative stress and birth defects in infants of women with pregestational diabetes*. MEDICC Review 2013; 15 (1): 37-40 ISSN 1527-3172
5. Fernández Romero T, Clapés Hernández S, **Suárez Román G**, Perera Calderín A, Rodríguez Sosa VM, Purón Guzmeli CA, Herrera Álvarez M, Antiguas Pendás A, Castro Martínez T. Embriopatía diabética en ratas y efecto de un suplemento

nutricional de vitamina E durante la gestación. Revhabancienméd 2013; 12(2):ISSN 1729-519X

6. Romero TF, Hernández SC, **Román GS**, González L, Rodríguez S, García MA. Alpha-Tocopherol Supplementation Diminishes the Renal Damage Caused by Experimental Diabetes. J Diabetes Metab 2015; 6(1):458

Trabajos presentados en eventos nacionales

1. Determinación de productos avanzados de oxidación de proteínas (PAOP) en embarazadas y ratas obesas y diabéticas. Resultados preliminares. Convención Científica y Fórum de Base, Facultad de Ciencias Médicas “Enrique Cabrerías”, 2010 (**Mención**).
2. Estandarización de un modelo en ratas para inducir Obesidad. Jornada Científica Girón y Fórum de base Girón 2013 (**Destacado**).
3. El efecto de la obesidad pregestacional sobre el desarrollo prenatal. XIV Jornada Anual Bioquímica Abierta 2015.

Trabajos presentados en eventos internacionales

1. *Oxidative damage associated to obesity and diabetes. Implications on teratogenesis.* 4to. Congreso internacional de prediabetes y síndrome metabólico. Madrid, España, 2011.
2. Embriotoxicidad y estado redox en ratas obesas durante la gestación. XXIII Reunión de la Asociación Latinoamericana de Investigadores en Reproducción Humana (ALIRH), Cancún, México, 2013.
3. Indicadores metabólicos y de estrés oxidativo en un modelo experimental de obesidad. IX Congreso Internacional de Factores de Riego de Aterosclerosis (FRATEROS), La Habana, Cuba, 2014.

4. Oxidative Stress Biomarkers in Obese Pregnant Rats. 15th International Conference on Oxidative Stress Reduction, Redox Homeostasis & Antioxidants. Instituto Pasteur. París, Francia, 2015.

Tesis tuteladas

Trabajos de terminación de residencia en Bioquímica clínica

Evaluación del efecto de la vitamina E en ratas obesas preñadas y su descendencia.

Efecto de la vitamina E en la capacidad reproductiva de ratas obesas y en el desarrollo fetal de su descendencia.

Tesis de maestría

Efecto de la obesidad inducida con glutamato monosódico sobre el estado metabólico y arterias de gran calibre.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*. 2014 Aug; 384 (9945): 766-781.
2. Bonet M, Varona P. III Encuesta nacional de factores de riesgo y actividades preventivas de enfermedades no transmisibles. Cuba 2010-2011. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2014.
3. Matsuda M, Shimomura L. Increased oxidative stress in obesity: Implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. *Obes Res Clin Pract*. 2013 Sep-Oct; 7 (5): e330-e341.
4. Tchernof A, Després JP. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev*. 2013 Jan; 93 (1): 359–404.
5. Savini I, Catani MV, Evangelista D, Gasperi V, Avigliano L. Obesity-associated oxidative stress: strategies finalized to improve redox state. *Int J Mol Sci*. 2013 May; 14 (5): 10497-10538.
6. Le Lay S, Simard G, Martinez MC, Andriantsitohaina R. Oxidative stress and metabolic pathologies: from an adipocentric point of view. *Oxid Med Cell Longev*. 2014; 2014: 1-18.
7. Marseglia L, Manti S, D'Angelo G, Nicotera A, Parisi E, Di Rosa G et al. Oxidative stress in obesity: a critical component in human diseases. *Int J Mol Sci*. 2015 Dec; 16: 378-400.
8. Marchi J, Berg M, Dencker A, Olander EK, Begley C. Risks associated with obesity in pregnancy, for the mother and baby: a systematic review of reviews. *Obes Rev*. 2015 Aug; 16 (8):1-18.
9. Lim CC, Mahmood T. Obesity in pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2015 Apr; 29(3): 309-319.
10. Gaudet L, Ferraro ZM, Wen SW, Walker M. Maternal obesity and occurrence of fetal macrosomia: a systematic review and meta-analysis. *BioMed Res Int*. 2014 Dec; 2014: 640291.
11. Aune D, Saugstad OD, Henriksen T, Tonstad S. Maternal body mass index and the risk of fetal death, stillbirth, and infant death: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2014 Apr; 311 (15): 1536-1546.
12. Iessa N, Bérard A. Update on prepergnancy maternal obesity: birth defects and childhood outcomes. *J Pediatr Genet*. 2015 Jun; 4 (2): 71-83.

13. Ford SP, Tuersunjiang N. Maternal obesity: how big an impact does it have on offspring prenatally and during postnatal life? *Expert Rev Endocrinol Metab.* 2013; 8 (3): 261–273.
14. Ministerio de Salud Pública. Dirección Nacional de Registros Médicos y Estadísticas de Salud. Anuario estadístico de salud 2016. En: <http://www.sld.cu/sitios/dne>
15. Rasmussen SA, Chu SY, Kim SY, Schmid CH, Lau J. Maternal obesity and risk of neural tube defects: a metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol.* 2008 Jun; 198 (6): 611-19.
16. Stothard KJ, Tennant PWG, Bell R, Rankin J. Maternal overweight and obesity and the risk of congenital anomalies: a systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 2009 Feb; 301(6):636-50.
17. Block SR, Watkins SM, Salemi JL, Rutkowski R, Tanner JP, Correia JA, et al. Maternal pre-pregnancy body mass index and risk of selected birth defects: evidence of a dose–response relationship. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2013 Nov; 27(6): 521–531.
18. Cai G, Sun X, Zhang L, Hong Q. Association between maternal body mass index and congenital heart defects in offspring: a systematic review. *Am J Obstet Gynecol.* 2014 Aug; 211 (2): 91-117.
19. Fernández RH, Collazo LV, Hernández SC, Cruz AL. Relationship between maternal obesity and congenital malformation in a subpopulation of havana. *J Diabetes Metab.* 2015; 6 (2): 498.
20. Beck B, Richy S, Archer ZA, Mercer JG. Ingestion of carbohydrate-rich supplements during gestation programs insulin and leptin resistance but not body weight gain in adult rat offspring. *Front Physiol.* 2012 Jun 25; 3: 224.
21. Guberman C, Jellyman JK, Han G, Ross MG, Desai M. Maternal high-fat diet programs rat offspring hypertension and activates the adipose renin-angiotensin system. *Am J Obstet Gynecol.* 2013 Sep; 209 (3): 262. e1-e8.
22. Zambrano E, Nathanielsz PW. Mechanisms by which maternal obesity programs offspring for obesity: evidence from animal studies. *Nutr Rev.* 2013 Oct; 71(suppl. 1):S42–S54.
23. Pruis MG, Lendvai A, Bloks VW, Zwier MV, Baller JF, de Bruin A et al. Maternal western diet primes non-alcoholic fatty liver disease in adult mouse offspring. *Acta Physiol (Oxf).* 2014 Jan; 210 (1): 215-227.
24. Taylor PD, Samuelsson AM, Poston L. Maternal obesity and the developmental programming of hypertension: a role for leptin. *Acta Physiol (Oxf).* 2014 Mar; 210 (3): 508–523.

25. Desai M, Jellyman JK, Han G, Beall M, Lane RH, Ross MG. Maternal obesity and high-fat diet program offspring metabolic syndrome. *Am J Obstet Gynecol*. 2014 Sep; 211 (3): 237.e1-e13.
26. Jungheim ES, Schoeller EL, Marquard KL, Loudon ED, Schaffer JE, Moley KH. Diet-induced obesity model: abnormal oocytes and persistent growth abnormalities in the offspring. *Endocrinology*. 2010 Aug; 151(8): 4039–4046.
27. Hayes EK, Lechowicz A, Petrik JJ, Storozhuk Y, Paez-Parent S, Dai Q et al. Adverse fetal and neonatal outcomes associated with a life-long high fat diet: role of altered development of the placental vasculature. *PLoS One*. 2012; 7(3): e33370.
28. Rule DC, Zhu MJ, Nathanielsz PW, Ford SP. Maternal obesity upregulates fatty acid and glucose transporters and increases expression of enzymes mediating fatty acid biosynthesis in fetal adipose tissue depots. *J Anim Sci*. 2012 Jul; 90 (7): 2201–2210.
29. Stachowiak EK, Srinivasan M, Stachowiak MK, Patel MS. Maternal obesity induced by a high fat diet causes altered cellular development in fetal brains suggestive of a predisposition of offspring to neurological disorders in later life. *Metab Brain Dis*. 2013 Dec; 28 (4): 721–725.
30. Gaccioli F, White V, Capobianco E, Powell TL, Jawerbaum A, Jansson T. Maternal overweight induced by a diet with high content of saturated fat activates placental mTOR and eIF2alpha signaling and increases fetal growth in rats. *Biol Reprod*. 2013 Oct; 89 (4): 96.
31. Bermejo-Alvarez P, Rosenfeld CS, Roberts RM. Effect of maternal obesity on estrous cyclicity, embryo development and blastocyst gene expression in a mouse model. *Hum Reprod*. 2012 Dec; 27(12): 3513–3522.
32. Correa A, Marcinkevage J. Prepregnancy obesity and the risk of birth defects: an update. *Nutr Rev*. 2013 Oct; 71(suppl 1):S68-S77.
33. Viana M, Herrera E, Bonet B. Teratogenic effects of diabetes mellitus in the rat. Prevention with vitamin E. *Diabetologia*. 1996 Sep; 39 (9): 1041-46.
34. Sivan E, Lee YK, Wu YK, Reece EA. Free radical scavenging enzymes in fetal dysmorphogenesis among offspring of diabetic rats. *Teratology*. 1997 Dec; 56 (6): 343-349.
35. Fernández T, Clapes S, Suárez G, et al. Embriopatía diabética en ratas y efecto de un suplemento nutricional de vitamina E durante la gestación. *Rev Haban Cienc Méd*. 2012; 12 (2): 176-186.
36. Damasceno DC, Kempinas WG, Tadeu GT, Consoni M, Cunha MV, Paumgartten FJ. Anomalias congênitas: estudos experimentais. Belo Horizonte: Coopmed; 2008. 102 p.

37. Keaney Jr JF, Larson MG, Vasan RS, Wilson PW, Lipinska I, Corey D, et al. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 Mar; 23 (3): 434-439.
38. Maithilikarpagaselvi N, Sridhar MG, Swaminathan RP, Sripradha R. Preventive effect of curcumin on inflammation, oxidative stress and insulin resistance in high-fat fed obese rats. *J Complement Integr Med.* 2016 Jun; 13 (2): 137-43.
39. Lubrano C, Valacchi G, Specchia P, Gnessi L, Rubanenko EP, Elena A. Shuginina EA, et al. Integrated haematological profiles of redox status, lipid, and inflammatory protein biomarkers in benign obesity and unhealthy obesity with metabolic syndrome. *Oxid Med Cell Longev.* 2015 May; 2015: 490613.
40. Rajasingam D, Seed PT, Briley AL, Shennan AH, Lucilla Poston L. A prospective study of pregnancy outcome and biomarkers of oxidative stress in nulliparous obese women. *AmJ Obstet Gynecol.* 2009 Apr; 200(4): 395. e1-9.
41. Malti N, Merzouk H, Merzouk SA, Loukidi B, Karaouzene N, Malti A, et al. Oxidative stress and maternal obesity: fetal-placental unit interaction. *Placenta.* 2014 Jun; 35 (6): 411-416.
42. Sen S, Lyer C, Meydani SN. Obesity during pregnancy alters maternal oxidant balance and micronutrient status. *J perinatal.* 2014 Feb; 34 (2): 105-111.
43. Loukidi B, Merzouk H, Merzouk SA, Malti N, Taouli K, Belarbi B et al. Thrombosis factors and oxidant/antioxidant markers in obese and hypertensive women during pregnancy. *Blood Press.* 2015 Apr; 24 (4): 242-249.
44. Gabbay-Benziv R, Reece EA, Wang F, Yang P. Birth defects in pregestational diabetes: defect range, glycemic threshold and pathogenesis. *World J Diabetes.* 2015 Apr; 6(3): 481-488.
45. Von Diemen V, Trindade EN, Trindade MR. Experimental model to induce obesity in rats. *Acta Cir Bras.* 2006 Nov-Dec; 21(6): 425-429.
46. Bernardis LL, Patterson BD. Correlation between Lee Index and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J Endocrinol.* 1968 Apr; 40 (4): 527-528.
47. Kumar V, Abbas A, Fausto N, Aster J. Robbins y Cotran: Patología estructural y funcional. 8va ed. Barcelona: Elsevier España; 2010. Capítulo 9, Enfermedades ambientales y nutricionales; p. 399-445.
48. Roh E, Kim M. Brain regulation of energy metabolism. *Endocrinol Metab (Seoul).* 2016 Dec; 31 (4): 519-524.
49. Singh RK, Kumar P, Mahalingam K. Molecular genetics of human obesity: a comprehensive review. *C R Biol.* 2017 Jan; pii:S1631-0691 (16) 30189-5.

50. Heymsfield SB, Wadden TA. Mechanisms, pathophysiology, and management of obesity. *N Engl J Med*. 2017 Jan; 376 (3): 254-266.
51. Grygiel-Górniak B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications –a review. *Nutr J*. 2014 Feb; 13:17.
52. Girouss A, Langin D. Adipocyte lipases and lipid droplet-associated proteins: insight from transgenic mouse models. *Int J Obes (Lond)*. 2012 Apr; 36 (4): 581–594.
53. Kraemer N, Farese RV, Walther TC. Balancing the fat: lipid droplets and human disease. *EMBO Mol Med*. 2013 Jul; 5 (7): 905–915.
54. Aon M, Bhatt N, Cortassa S. Mitochondrial and cellular mechanisms for managing lipid excess. *Front Physiol*. 2014 Jul; 5: 282.
55. Pickens CA, Sordillo LM, Comstock SS, Harris WS, Hortos K, Kovan B et al. Plasma phospholipids, non-esterified plasma polyunsaturated fatty acids and oxylipids are associated with BMI. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2014 Apr; 95: 31-40.
56. Martins AR, Nachbar RT, Gorjao R, Vinolo MA, Festuccia WT, Lambertucci RH et al. Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. *Lipids Health Dis*. 2012 Feb; 11(30).
57. Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell*. 2012 Mar; 148 (5): 852-71.
58. Boden G. Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2011 Apr; 18 (2): 139-43.
59. Hafizi Abu Bakar M, Kian Kai C, Wan Hassan WN, Sarmidi MR, Yaakob H, Zaman Huri H. Mitochondrial dysfunction as a central event for mechanisms underlying insulin resistance: the roles of long chain fatty acids. *Diabetes Metab Res Rev*. 2015 Jul; 31 (5): 453-475.
60. Bondia-Pons I, Ryan L, Martinez JA. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. *J Physiol Biochem*. 2012 Dec; 68 (4):701-711.
61. Tripathi Y, Pandey V. Obesity and endoplasmic reticulum (ER) stresses. *Front Immunol*. 2012 Aug; 3: 240.
62. Gregor M, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol*. 2011; 29: 415-445.
63. de Git KC, Adan RA. Leptin resistance in diet-induced obesity: the role of hypothalamic inflammation. *Obes Rev*. 2015 Mar; 16 (3): 207–224.

64. Abel ED, Sweeney G. Modulation of the cardiovascular system by leptin. *Biochimie*. 2012 Oct; 94 (10): 2097-2103.
65. Kalyanaraman B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol*. 2013 Feb; 1: 244-257.
66. Hansen JM, Harris C. Redox control of teratogenesis. *Reprod Toxicol*. 2013 Jan; 35: 165- 179.
67. Weidinger A, Kozlov AV. Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction. *Biomolecules*. 2015 Apr; 5 (2): 472-484.
68. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S et al. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed Res Int*. 2014 Jan; 2014: 761264.
69. Li H, Horke S, Förstermann U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2014 Nov; 237 (1): 208-219.
70. Guéraud F, Atalay M, Bresgen N, Cipak A, Eckl PM, Huc L et al. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic Res*. 2010 Oct; 44(10): 1098–1124.
71. Chondrogianni N, Petropoulos I, Grimm S, Georgila K, Catalgol B, Friguet B et al. Protein damage, repair and proteolysis. *Mol Aspects Med*. 2014 Feb; 35: 1–71.
72. Dizdaroglu M, Jaruga P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Res*. 2012 Apr; 46(4): 382–419.
73. Santos RX, Correia SC, Zhu X, Lee H, Petersen RB, Nunomura A et al. Nuclear and mitochondrial DNA oxidation in Alzheimer ' s disease. *Free Radic Res*. 2012 Apr; 46(4): 565–576.
74. Schönfeld P, Wojtczak L. Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*. 2008 Aug; 45 (3): 231-41.
75. Schönfeld P, Schlüter T, Fischer KD, Reiser G. Non-esterified polyunsaturated fatty acids distinctly modulate the mitochondrial and cellular ROS production in normoxia and hypoxia. *J Neurochem* 2011. Jul; 118 (1):69-78.
76. Clapés S, Fernández T, Suárez G. Oxidative stress and birth defects in infants of women with pregestational diabetes. *MEDICC Rev*. 2013 Jan; 15 (1): 37-40.
77. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev*. 2014 Jul; 94: 909–950.

78. Hauguel-de Mouzon S, Lassance L. Endocrine and metabolic adaptations to pregnancy; impact of obesity. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2015 Oct; 24(1): 65–72.
79. Ghio A, Bertolotto A, Resi V, Volpe L, Di Cianni G. Triglyceride metabolism in pregnancy. *Adv Clin Chem*. 2011; 55: 133-153.
80. Gitto E, Pellegrino S, Gitto P, Barberi I, Reiter RJ. Oxidative stress of the newborn in the pre- and postnatal period and the clinical utility of melatonin. *J Pineal Res*. 2009 Mar; 46 (2):128–139.
81. Dennerly PA. Oxidative stress in development: nature or nurture? *Free Radic Biol Med*. 2010 Oct; 49 (7): 1147-1151.
82. Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol*. 2012 Jun; 10:49.
83. Dennerly PA. Effects of oxidative stress on embryonic development. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2007 Sep; 81 (3): 155-162.
84. Wang XD, Morgan SC, Loeken MR. Pax3 stimulates p53 ubiquitination and degradation independent of transcription. *PLoS One*. 2011 Dec; 6 (12): e29379.
85. Morgan SC, Relaix F, Sandell LL, Loeken MR. Oxidative stress during diabetic pregnancy disrupts cardiac neural crest migration and causes outflow tract defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2008 Jun; 82(6):453-463.
86. Wu Y, Viana M, Thirumangalathu S, Loeken MR. AMP-activated protein kinase mediates effects of oxidative stress on embryo gene expression in a mouse model of diabetic embryopathy. *Diabetologia*. 2012 Jan; 55(1):245-254.
87. Wei D, Loeken MR. Increased DNA methyltransferase 3b (Dnmt3b)-mediated CpG island methylation stimulated by oxidative stress inhibits expression of a gene required for neural tube and neural crest development in diabetic pregnancy. *Diabetes*. 2014 Oct; 63 (10): 3512-3522.
88. Cao Y, Zhao Z, Eckert RL, Reece EA. Protein Kinase C β 2 inhibition reduces hyperglycemia-induced neural tube defects through suppression of a caspase 8-triggered apoptotic pathway. *Am J Obstet Gynecol*. 2011 Mar; 204 (3): 226. e1–e5.
89. Speakman J, Hambly C, Mitchell S, Król E. The contribution of animal models to the study of obesity. *Lab Anim*. 2008 Oct; 42 (4): 413-432.
90. Soares MJ, Chakraborty D, Karim MA, Konno T, Renaud SJ. Rat placentation: an experimental model for investigating the hemochorial maternal-fetal interface. *Placenta*. 2012 Apr; 33 (4): 233-243.
91. Jawerbaum A, White V. Animal models in diabetes and pregnancy. *Endocr Rev*. 2010 Oct; 31(5):680–701.

92. Husarova V, Ostatnikova D. Monosodium glutamate toxic effects and their implications for human intake: a review. *JMED Research*. 2013; 2013.
93. Olney JW. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*. 1969 May;164 (3880): 719–721.
94. Lobato NS, Filgueira FP, Hagihara GN, Akamine EH, Pariz JR, Tostes RC et al. Improvement of metabolic parameters and vascular function by metformin in obese non-diabetic rats. *Life Sci*. 2012 Jan; 90 (5-6): 228–235.
95. Rotimi OA, Olayiwola IO, Ademuyiwa O, Balogun EA. Effects of fibre-enriched diets on tissue lipid profiles of MSG obese rats. *Food Chem Toxicol*. 2012 Nov; 50 (11): 4062–4067.
96. Seiva F, Chuffa LG, Pereira C, Amorim JP, Fernandes AA. Quercetin ameliorates glucose and lipid metabolism and improves antioxidant status in postnatally monosodium glutamate-induced metabolic alterations. *Food Chem Toxicol*. 2012 Oct; 50 (10): 3556–3561.
97. Damasceno DC, Sinzato YK, Bueno A, Dallaqua B, Lima PH, Calderon I et al. Metabolic profile and genotoxicity in obese rats exposed to cigarette smoke. *Obesity (Silver Spring)*. 2013 Aug; 21(8):1596-601.
98. França LM, Freitas LN, Chagas VT, Coêlho CF, Barroso WA, Costa GC et al. Mechanisms underlying hypertriglyceridemia in rats with monosodium L-glutamate-induced obesity: evidence of XBP-1/PDI/MTP axis activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Jan; 443 (2):725–730.
99. Savcheniuk O, Kobylak N, Kondro M, Virchenko O, Falalyeyeva T, Beregova T. Short-term periodic consumption of multiprobiotic from childhood improves insulin sensitivity, prevents development of non-alcoholic fatty liver disease and adiposity in adult rats with glutamate-induced obesity. *BMC Complement Altern Med*. 2014 Jul; 14:247.
100. Chen W, Chen Z, Xue N, Zheng Z, Li S, Wang L. Effects of CB1 receptor blockade on monosodium glutamate induced hypometabolic and hypothalamic obesity in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2013 Aug; 386 (8):721–732.
101. Fujimoto M, Tsuneyama K, Nakanishi Y, Salunga TL, Nomoto K, Sasaki Y et al. A dietary restriction influences the progression but not the initiation of MSG-induced nonalcoholic steatohepatitis. *J Med Food*. 2014 Mar; 17 (3): 374–383.
102. Gudiño-Cabrera G, Ureña-Guerrero ME, Rivera-Cervantes MC, Feria-Velasco AI, Beas-Zárate C. Excitotoxicity triggered by neonatal monosodium glutamate treatment and blood-brain barrier function. *Arc Med Res*. 2014 Nov; 45 (8):653-659.
103. Fouilloux C, Contreras F, Rivera M, Terán A, Velasco M. Receptores de glutamato. Implicaciones terapéuticas. *AVFT*. 2004 Jul; 23 (2).

104. Bayne K, Turner PV, editors. Laboratory animal welfare. London: Academic Press; c2014. 309 p.
105. AVMA 2013. American Veterinary Medical Association guidelines for the euthanasia of animals. Edición 2013. Disponible en: <https://www.avma.org/KB/Policias/Documents/euthanasia.pdf>.
106. Morrison JFB, Shehab S, Sheen R, Dhanasekaran S, Shaffiullah M, Mensah-Brown E. Sensory and autonomic nerve changes in the monosodium glutamate-treated rat: a model of type II diabetes. *Exp Physiol*. 2007 Feb; 93 (2): 213–222.
107. Matyšková R, Maletínská I, Maixnerová J, Pírník Z, Kiss A, Železná B. Comparison of the obesity phenotypes related to monosodium glutamate effect on arcuate nucleus and/or the high fat diet feeding in C57BL/6 and NMRI mice. *Physiol Res*. 2008; 57: 727-734.
108. da Cunha NV, Pinge-Filho P, Panis C, Silva BR, Pernomian L, Grando MD, Cecchini R, Bendhack LM, Martins-Pinge MC. Decreased endothelial nitric oxide, systemic oxidative stress, and increased sympathetic modulation contribute to hypertension in obese rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014 May; 306 (10): H1472–H1480.
109. Krinke GJ, editor. The laboratory rat: the handbook of experimental animals. London: Academic Press; 2000. 756 p.
110. Sengupta P. The laboratory rat: relating its age with human's. *Int J Prev Med* 2013 Jun; 4 (6): 624-630.
111. Hood RD, editor. Developmental and reproductive toxicology: a practical approach. 2nd ed. New York: CRC Press 2006. 1127 p.
112. Fernández T. Beneficios de la suplementación con α -tocoferol en ratas diabéticas y su descendencia [tesis] La Habana: Universidad de Ciencias Médicas; 2015.
113. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1968; 97: 77-89.
114. Bunce M. PCR-SSP typing. England: Imperial College Press; 2000. Capítulo 5, Histocompatibility testing; p. 149-86.
115. Capote C. Efecto de la obesidad inducida con glutamato monosódico sobre arterias de gran calibre y el estado metabólico en ratas Wistar adultas [tesis] La Habana: Universidad de Ciencias Médicas; 2017.
116. Aliverti V, Bonanomi L, Giavini E. The extent of fetal ossification as an index of delayed development in teratogenic studies on the rat. *Teratology*. 1979 Oct; 20 (2):237-42.

117. Makris SL, Solomon HM, Clark R, Shiota K, Barbellion S, Buschmann J et al. Terminology of developmental abnormalities in common laboratory mammals (Version 2). *Congenit Anom (Kyoto)*. 2009 Sep; 49 (3): 123–246.
118. Solecki R, Barbellion S, Bergmann B, Bürgin H, Buschmann J, Clark R et al. Harmonization of description and classification of fetal observations: achievements and problems still unresolved: report of the 7th Workshop on the terminology in developmental toxicology Berlin, 4–6 May 2011. *Reprod toxicol*. 2013 Jan; 35: 48-55.
119. Novelli ELB, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GMX, Rodrigues HG, Mani F, et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim*. 2007 Jan; 41 (1): 111–119.
120. Suardiáz J, Cruz C, Colina A. Laboratorio clínico. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2004. 661 p.
121. Gornal AG, Bardawill CJ, MM David. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem*. 1949 Feb; 177 (2): 751-766.
122. Arranz C, González-Suárez RM. Utilización de un método rápido para la separación de la hormona libre y unida en el radioinmunoensayo de insulina. *Rev Cubana Invest Biomed*. 1988; 7:150–156.
123. Mathews DR, Hosker JP, Rudenki AS, Nailor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man. *Diabetologia*. 1985 Jul; 28 (7): 412–419.
124. Cacho J, Sevillano J, de Castro J, Herrera E, Ramos MP. Validation of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008 Nov; 295 (5): E1269–1276.
125. Turkez H, Aydın E, Geyikoglu F, Cetin D. Genotoxic and oxidative damage potentials in human lymphocytes after exposure to terpinolene in vitro. *Cytotechnology*. 2015 May; 67 (3): 409-18.
126. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malondialdehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*. 1990; 186: 407-421.
127. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int*. 1996 May; 49 (5): 1304-1313.
128. Kalousavá M, Skrha J, Zima T. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with Diabetes Mellitus. *Physiol Res*. 2002; 51 (6): 597-604.

129. Gutteridge JM. Free-radical damage to lipids, aminoacids, carbohydrates and nucleic acids determined by thiobarbituric acid reactivity. *Int J Biochem.* 1982; 14 (7): 649-53.
130. Hisakazu M. Determination of nitrate in biological fluids using nitrate reductase in a flow system. *J Health Sci.* 2001; 47 (1): 65-7.
131. Beutler E. Improved assay of the enzymes of glutathione synthesis. *Clin Chim Acta.* 1986 Jul; 158 (1): 115-23.
132. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in autoxidation of pyrogallol as a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem.* 1974 Sep; 47 (3): 469-474.
133. Beer RF, Sizer IW. Spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem.* 1952; 195: 137-40.
134. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans.* 2007 Nov; 35 (5):1147–1150.
135. Campos KE, Volpato G, Clderon I, Rudge M, Damasceno DC. Effect of obesity on rat reproduction and on the development of their adult offspring. *Braz J Med Biol Res.* 2008 Feb; 41(2): 122-125.
136. Ejdesjö A, Wentzel P, Eriksson UJ. Influence of maternal metabolism and parental genetics on fetal maldevelopment in diabetic rat pregnancy. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012 May; 302 (10): E1198-209.
137. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the foling phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov; 193 (1): 265-275.
138. Silva HJ, Marinho SMO, Silva AETM, Albuquerque CG, Moraes SRA, Manhães de Castro R. Protocol of meensuration to avaliatio of indicators of somatic development of Wistar rats. *Int J Morphol.* 2005; 23 (3): 227-230.
139. Volpato GT, Francia-Farje LAD, Damasceno DC, Oliveira RV, Hiruma-Lima CA, Kempinas WG. Effect of essential oil from *Citrus aurantium* in maternal reproductive outcome and fetal anomaly frequency in rats. *An Acad Bras Cienc.* 2015 Mar; 87(1): 407-415.
140. Guyton AC, Hall JE. *Tratado de fisiología médica.* 12a ed. Barcelona: Elsevier Saunders; c2011. 1092 p.
141. Colectivo de autores. *Morfofisiología.* 2nd ed. Vol. II, Sistema nervioso. *Endocrinología básica.* La Habana: Ecimed; 2015. 470 p.
142. Zubiría MG, Vidal-Bravo J, Spinedi E, Giovambattista A. Relationship between impaired adipogenesis of retroperitoneal adipose tissue and hypertrophic obesity:

role of endogenous glucocorticoid excess. *J Cell Mol Med.* 2014 Aug; 18 (8): 1549-1561.

143. Moreno G, Perelló M, Camihort G, et al. Impact of transient correction of increased adrenocortical activity in hypothalamo damaged, hyperadipose female rats. *Int J Obes (Lond).* 2006 Jan; 30 (1): 73-82.

144. Guimarães ED, de Caires Júnior LC, Musso CM, Macedo de Almeida M, Gonçalves CF, Pettersen KG et al. Altered behavior of adult obese rats by monosodium L-glutamate neonatal treatment is related to hypercorticosteronemia and activation of hypothalamic ERK1 and ERK2. *Nurt Neurosci.* 2015 feb.

145. Farraú F 2015- Farraú F, Korbonits M. Metabolic comorbidities in Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol.* 2015; 173, M133–M157.

146. John K, Marino JS, Sánchez ER, Hinds TD. The glucocorticoid receptor: cause or cure for obesity? *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2016 Feb; 310 (4): E249-E257.

147. Schoelch C, Hübschle T, Schmidt I, Nuesslein-hildesheim B. MSG lesions decrease body mass of suckling-age rats by attenuating circadian decreases of energy expenditure. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002 Sep; 283 (3): E604–611.

148. Afifi MM, Abbas AM. Monosodium Glutamate versus diet induced obesity in pregnant rats and their offspring. *Acta Physiol Hung.* 2011 Jun; 98 (2): 177-188.

149. Chapman K, Holmes M, Seckl J. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases: intracellular gate-keepers of tissue glucocorticoid action. *Physiol Rev.* 2013 Jul; 93: 1139–1206.

150. Moya Y. Efecto de la obesidad inducida por el glutamato monosódico sobre el estado metabólico y la integridad del tejido hepático [tesis] La Habana: Universidad de Ciencias Médicas; 2017.

151. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007 Jan; 87(1): 315–424.

152. Bernardi M, Ricci CS, Zaccherini G. Role of human albumin in the management of complications of liver cirrhosis. *J Clin Exp Hepatol.* 2014 Dec; 4 (4): 302–311.

153. Gaspar RS, Benevides RO, Fontelles JL, Vale CC, França LM, Barros P de T et al. Reproductive alterations in hyperinsulinemic but normoandrogenic MSG obese female rats. *J Endocrinol.* 2016 May; 229 (2): 61-72.

154. Krajewski SJ, Burke MC, Anderson MJ, McMullen NT, Rance NE. Forebrain Projections of arcuate neurokinin B neurons demonstrated by anterograde tract-tracing and monosodium glutamate lesions in the rat. *Neuroscience.* 2010 March; 166 (2): 680–697.

155. Hausman GJ, Barb CR, Lents CA. Leptin and reproductive function. *Biochimie*. 2012 Oct; 94 (10): 2075-2081.
156. Michalakis K, Mintziori G, Kaprarab A, Tarlatzis BC, Goulis DG. The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: A narrative review. *Metabolism*. 2013 Apr; 62 (4): 457 – 478.
157. Klenov VE, Jungheim ES. Obesity and reproductive function: a review of the evidence. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2014 Dec; 26 (6): 455-460.
158. Zhang S, Lin H, Kong S, Wang S, Wanga H, Wang H et al. Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Mol Aspects Med*. 2013 Oct; 34 (5): 939–980.
159. Chappell JH Jr, Wang XD, Loeken MR. Diabetes and apoptosis: neural crest cells and neural tube. *Apoptosis*. 2009 Dec; 14 (12): 1472-1483.
160. Van Hock V, Bols PE, Binelli M, Leroy JL. Reduced oocyte and embryo quality in response to elevated non-esterified fatty acid concentrations: a possible pathway to subfertility? *Anim Reprod Sci*. 2014 Sep; 149 (1-2): 19-29.
161. Vaughan OR, Sferruzzi-Perri AN, Fowden AL. Maternal corticosterone regulates nutrient allocation to fetal growth in mice. *J Physiol*. 2012 Nov; 590 (21): 5529–5540.
162. Higgins L, Greenwood SL, Wareing M, Sibley CP, Mills TA. Obesity and the placenta: a consideration of nutrient exchange mechanisms in relation to aberrant fetal growth. *Placenta*. 2011 Jan; 32 (1): 1-7.
163. Vaughan OR, Fisher HM, Dionelis KN, Jefferies EC, Higgins JS, Musial B et al. Corticosterone alters materno-fetal glucose partitioning and insulin signalling in pregnant mice. *J Physiol*. 2015 Mar; 593 (5): 1307–1321.
164. Zhang D, Liu H, Zeng J, Miao X, Huang W, Chen H et al. Glucocorticoid exposure in early placentation induces preeclampsia in rats via interfering trophoblast development. *Gen Comp Endocrinol*. 2016 Jan; 225: 61–70.
165. Sakamaki H, Akazawa S, Ishibashi M, Izumino K, Takino H, Yamasaki H et al. Significance of glutathione-dependent antioxidant system in diabetes-induced embryonic malformations. *Diabetes*. 1999 May; 48 (5): 1138-1144.
166. Viana M, Aruoma OI, Herrera E, Bonet B. Oxidative damage in pregnant diabetic rats and their embryos. *Free Rad Biol Med* 2000 Dec; 29 (11): 1115–1121.
167. Wetzel P, Eriksson UJ. A diabetes environment increases malformation rate and diminishes prostaglandin E2 in rat embryos: reversal by administration of vitamin E and folic acid. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2005 Jul; 73 (7): 506-511.

168. Gäreskog M, Eriksson UJ, Wetzel P. Combined supplementation of folic acid and vitamin E diminishes diabetes-induced embryotoxicity in rats. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2006 Jun; 76 (6): 483-490.
169. Gäreskog M, Wetzel P. N-acetylcysteine and α -cyano-4-hydroxycinnamic acid alter protein kinase C (PKC)- δ and PKC- ζ and diminish dysmorphogenesis in rat embryos cultured with high glucose in vitro. *J Endocrinol.* 2007 Jan; 192 (1): 207-214.
170. Moore kl, Persaud TVN, Torchiva MG. *Embriología clínica.* 9na ed. Barcelona: Elsevier España; 2013. 389 p.
171. Pérez VJ, Olney JW. Accumulation of glutamic acid in the arcuate nucleus of the hypothalamus of the infant mouse following subcutaneous administration of monosodium glutamate. *J Neurochem.* 1972 Jul;19(7):1777-1782.
172. Heywood R, Worden AN. *Glutamic acid: advances in biochemistry and physiology.* New York: Raven Press; 1979. Chapter, Glutamate toxicity in laboratory animals; p. 203-15.
173. Rojo DM, Clapés S, Suárez G, Fernández T, López-Silveiro R, Rodríguez MA et al. Oxidative stress biomarkers in obese and overweight mothers and the relationships with the health of their newborns. *J Diabetes.* 2011 April; 3 Suppl 1: S221.
174. Jaunianux E, Cindrova-davies T, Johns J, Dunster C, Hempstock J et al. Distribution and transfer pathways of antioxidant molecules inside the first trimester human gestational sac. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 March; 89(3):1452–1458.
175. García-Giménez JL, Olaso G, Hake SB, Bönisch C, Wiedermann SM, Markovic J et al. Histone H3 glutathionylation in proliferating mammalian cells destabilizes nucleosomal structure. *Antioxid Redox Signal.* 2013 Oct; 19 (12): 1305-1320.
176. Gupta S, Arora S, Trivedi SS, Singh R. Dyslipidemia in pregnancy may contribute to increased risk of neural tube defects -a pilot study in north indian population. *Indian J Clin Biochem.* 2009 Apr; 24 (2): 150-154.
177. Nederlof M, de Walle HE, van Poppel MN, Vrijkotte TG, Gademan MG. Deviant early pregnancy maternal triglyceride levels and increased risk of congenital anomalies: a prospective community-based cohort study. *BJOG.* 2015 Aug; 122 (9): 1176-1183.
178. Cetin I, Parisi F, Berti C, Mandò C, Desoye G. Placental fatty acid transport in maternal obesity. *J Dev Orig Health Dis.* 2012 Dec; 3(6):409-14.
179. Zhao Z, Reece EA. New concepts in diabetic embryopathy. *Clin Lab Med.* 2013 Jun; 33(2): 207–233.

180. Slijivc S, Kamenov B, Maglajlic S, Djordjevic V, Stojkovic-Eferica I, Stojanovic M et al. Possible interactions of genetic and immuno-neuro-endocrine regulatory mechanisms in pathogenesis of congenital anomalies. *Med Hypotheses*. 2006 Mar; 67 (1): 57-64.
181. Roman-Ramos R, Almanza-Perez JC, Garcia-Macedo R, Blancas-Flores G, Fortis-Barrera A, Jasso EI et al. Monosodium glutamate neonatal intoxication associated with obesity in adult stage is characterized by chronic inflammation and increased mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptors in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2011 Jun; 108 (6): 406–413.
182. Svidnicki PV, Carvalho N, Vicari MR, de Almeida MC, Ferreira R, Favero GM et al. Swim training and the genetic expression of adipokines in monosodium glutamate treated obese rats. *Arch Endocrinol Metab*. 2015 Jun; 59 (3): 210-214.
183. Christian LM, Porter K. Longitudinal changes in serum proinflammatory markers across pregnancy and postpartum: effects of maternal body mass index. *Cytokine*. 2014 Dec; 70 (2): 134–140.
184. Uriu-Adams JY, Keen CL. Zinc and reproduction: effects of zinc deficiency on prenatal and early postnatal development. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2010 Aug; 89 (4): 313–325.
185. Wang X, Guan Z, Chen Y, Dong Y, Niu Y, Wang J. Genomic DNA hypomethylation is associated with neural tube defects induced by methotrexate inhibition of folate metabolism. *PLoS One*. 2015 Mar; 10(3):e0121869.
186. Kumar SD, Vijaya M, Samy RP, Dheen ST, Ren M, Watt F et al. Zinc supplementation prevents cardiomyocyte apoptosis and congenital heart defects in embryos of diabetic mice. *Free Radic Biol Med*. 2012 Oct; 53 (8): 1595-1606.
187. Kim H, Hwang JY, Kim KN, Ha EH, Park H, Ha M et al. Relationship between body-mass index and serum folate concentrations in pregnant women. *Eur J Clin Nutr*. 2012 Jan; 66 (1): 136–138.
188. Ichi S, Costa FF, Bischof JM, Nakazaki H, Shen Y, Boshnjaku V et al. Folic acid remodels chromatin on *Hes 1* and *Neurog 2* promoters during caudal neural tube development. *J Biol Chem*. 2010 Nov; 285 (47): 36922–36932.
189. Chandler AL, Hobbs CA, Mosley BS, Berry RJ, Canfield MA, Ping Y. Neural tube defects and maternal intake of micronutrients related to one-carbon metabolism or antioxidant activity. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2012 Nov; 94(11): 864–874.
190. Mariath AB, Berganaschi DP, Rondó PH, Tanaka AC, Hinning PF, Abbade JF et al. The possible role of selenium status in adverse pregnancy outcomes. *Br J Nutr*. 2011 May; 105 (10): 1418-1428.

191. Iessi IL, Bueno A, Sinzato YK, Taylor KN, Rudge MV, Damasceno DC. Evaluation of neonatally-induced mild diabetes in rats: maternal and fetal repercussions. *Diabetol Metab Syndr*. 2010 Jun; 2 (1): 37.
192. Saito FH, Damasceno DC, Kempinas WG, Morceli G, Sinzato YK, Taylor KN et al. Repercussions of mild diabetes on pregnancy in Wistar rats and on the fetal development. *Diabetol Metab Syndr*. 2010 Apr; 2 (1): 26.
193. Damasceno DC, Kiss ACI, Sinzato YK, de Campos KE, Rudge MVC, Calderon IMP. Maternal-fetal outcome, lipid profile and oxidative stress of diabetic rats neonatally exposed to streptozotocin. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2011 Jul; 119 (7): 408-413.
194. Dallaqua B, Saito FH, Rodrigues T, Calderon IM, Rudge MV, Volpato GT et al. *Azadirachta indica* treatment on the congenital malformations of fetuses from rats. *J Ethnopharmacol*. 2013 Dec; 150 (3): 1109-1113.
195. Kimmel CA, Garry MR, DeSesso JM. Relationship between bent long bones, bent scapulae, and wavy ribs: malformations or variations? *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2014 Oct; 101(5):379–392.
196. Paumgartner F, Solecki R, Buschmann J, Clark R, Grotee K, Rauch M et al. Harmonization of terminology in developmental toxicology: the quest for a more precise description and a harmonized classification of fetal observations. *Reprod Toxicol*. 2009 Jan; 27 (1): 8– 13.
197. Chung HR. Adrenal and thyroid function in the fetus and preterm infant. *Korean J Pediatr*. 2014 Oct; 57(10):425-433.
198. Reynolds RM. Impact of maternal steroids during pregnancy. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2016 Dec; 77 (6): 677-679.
199. Gaccioli F, Lager S, Powell T, Jansson T. Placental transport in response to altered maternal nutrition. *J Dev Orig Health Dis*. 2013 Apr; 4(2): 101–115.
200. Saben J, Lindsey F, Zhong Y, Thakali K, Badger TM, Andres A et al. Maternal obesity is associated with a lipotoxic placental environment. *Placenta*. 2014 Mar; 35 (3): 171-177.
201. Myatt L, Maloyan A. Obesity and placental function. *Semin Reprod Med*. 2016 Jan; 34 (1): 42–49.
202. Hastie R, Lappas M. The effect of pre-existing maternal obesity and diabetes on placental mitochondrial content and electron transport chain activity. *Placenta*. 2014 Sep; 35 (9): 673-683.
203. Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2011 Jun; 25 (3): 287–299.

204. Sánchez-Aranguren LC, Prada CE, Riaño-Medina CE, Lopez M. Endothelial dysfunction and preeclampsia: role of oxidative stress. *Frontier in Physiology*. 2014 Oct; 5: 372.

205. Dai DM, Cao J, Yang HM, Sun HM, Sua Y, Chen YY et al. Hematocrit and plasma albumin levels difference may be a potential biomarker to discriminate preeclampsia and eclampsia in patients with hypertensive disorders of pregnancy. *Clin Chim Acta*. 2017 Jan; 464: 218–222.

ANEXOS

ANEXO 1

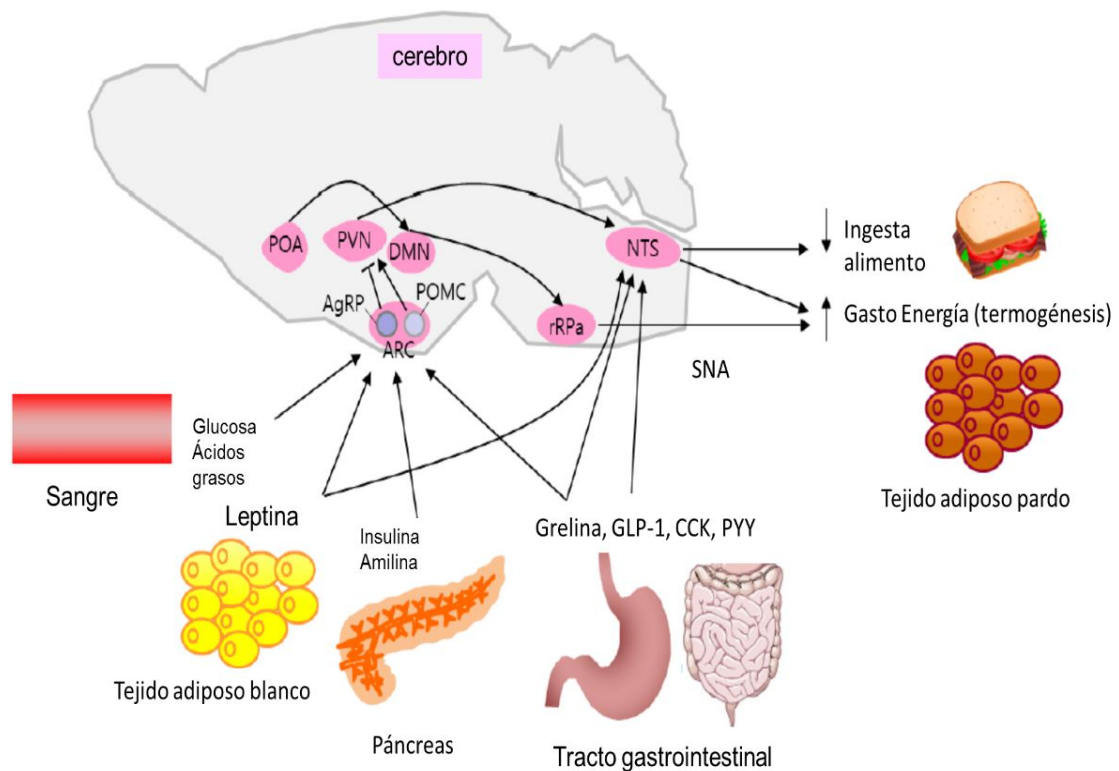


Figura 1. Modelo de regulación del balance energético (modificado de: Roh E. 2016)⁴⁸. El cerebro integra múltiples señales aferentes metabólicas tales como nutrientes, hormonas derivadas del tracto gastrointestinal [grelina, péptido 1 semejante al glucagón (GLP-1), colecistoquinina (CKK) y péptido YY], y señales relacionadas con la adiposidad (leptina e insulina) para regular la ingesta de alimento y el gasto energético. Neuronas productoras de pro-opiomelanocortina (POMC) y neuronas productoras de neuropéptido Y (NPY)/ péptido relacionado con Agouti (AgRP) en el núcleo arqueado hipotalámico (ARC) sensan el estado energético del cuerpo y proyectan hacia otros núcleos hipotalámicos, incluyendo el paraventricular (PVN) donde se localizan las neuronas de segundo orden y el lateral (no mostrado). Estos, a su vez, proyectan hacia el núcleo del tracto solitario (NTS) en el tronco encefálico. El NTS responde a señales de saciedad procedentes del hipotálamo o que llegan directamente, activando la conexión aferente vagal para reducir la ingesta alimenticia. El área preóptica (POA) en el hipotálamo recibe señales sensoriales térmicas por exposición al frío y activa la vía POA-hipotálamo dorsomedial (DMN)-pálido del rafe rostral (rRPa) y promueve la termogénesis en el tejido adiposo pardo. El rRPa contiene neuronas simpáticas premotoras que transmiten señales que activan la termogénesis en el tejido adiposo blanco incrementándose el gasto energético.

ANEXO 2

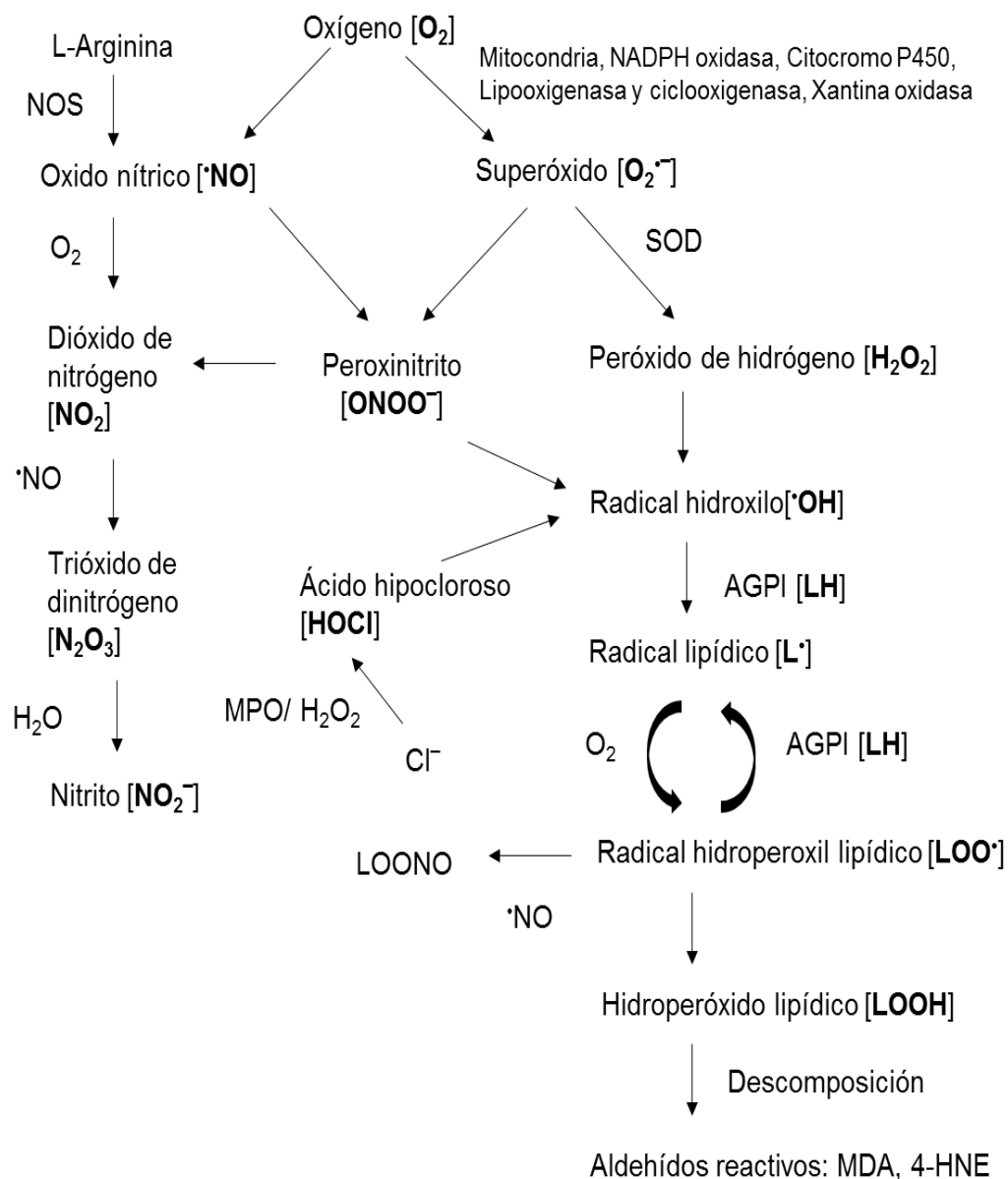
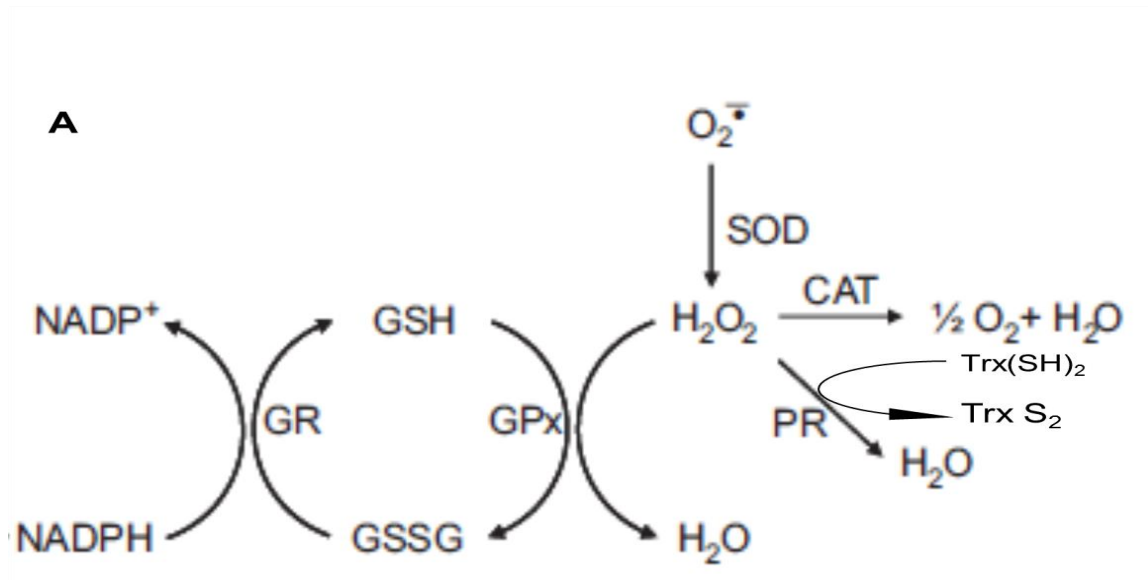


Figura 2. Generación de especies reactivas del oxígeno (modificado de: Kalyanaraman B. 2013)⁶⁵. NOS: óxido nítrico sintetasa. SOD: superóxido dismutasa. MPO: mieloperoxidasa. AGPI: ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. MDA: malonildialdehído. 4-HNE: 4- hidroxinonenal.

ANEXO 3



B

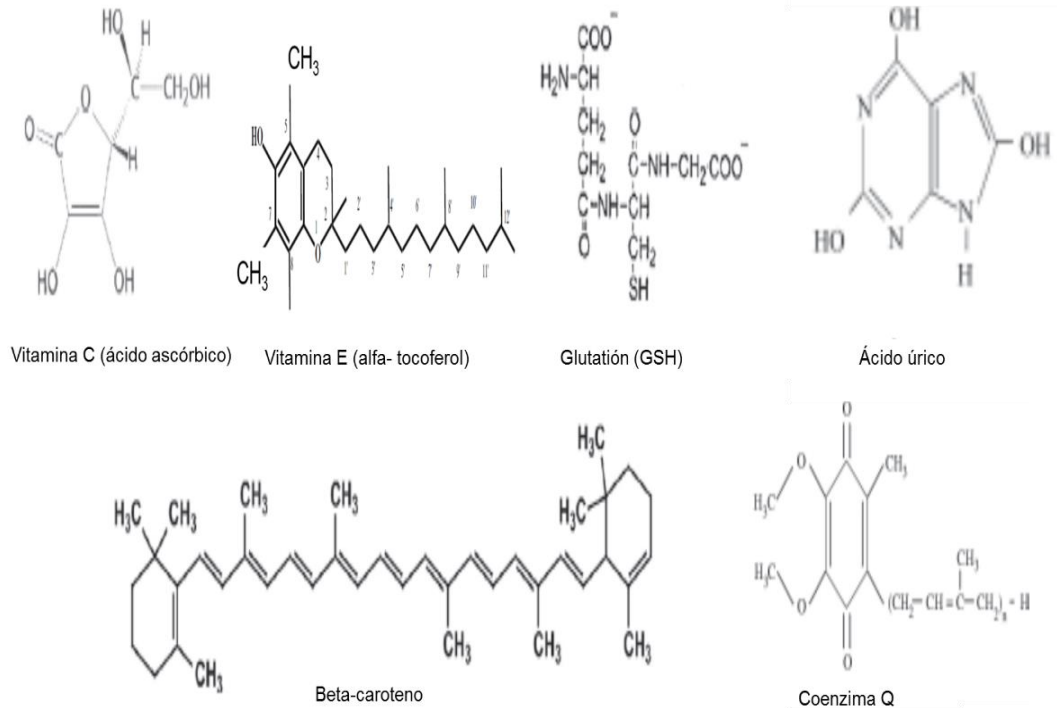


Figura 3. Antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (modificado de: Kalyanaraman B. 2013)⁶⁵. A: sistemas antioxidantes enzimáticos. B: antioxidantes no enzimáticos de bajo peso molecular. GR: glutati3n reductasa. GPx: glutati3n peroxidasa. SOD: super3xido dismutasa. CAT: catalasa. PR: peroxirredoxina. Trx: tioredoxina.

ANEXO 4

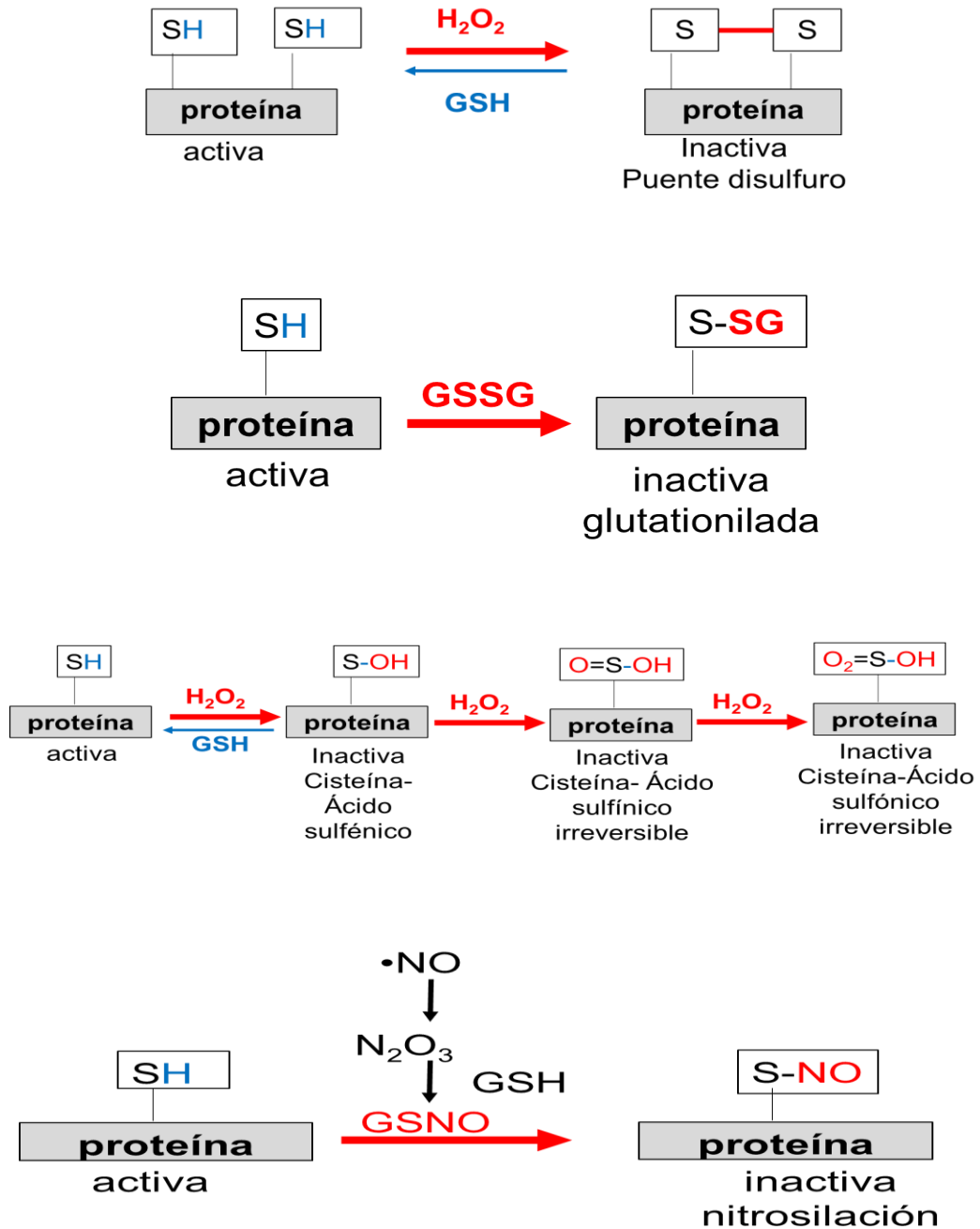


Figura 4. Oxidación y nitración de grupos sulfhidrilos en las proteínas (-SH). GSH: glutatión reducido. GSSH: glutatión oxidado. H_2O_2 : peróxido de hidrógeno. $\bullet NO$: óxido nítrico. N_2O_3 : trióxido de dinitrógeno. GSNO: especie oxidada del glutatión

ANEXO 5

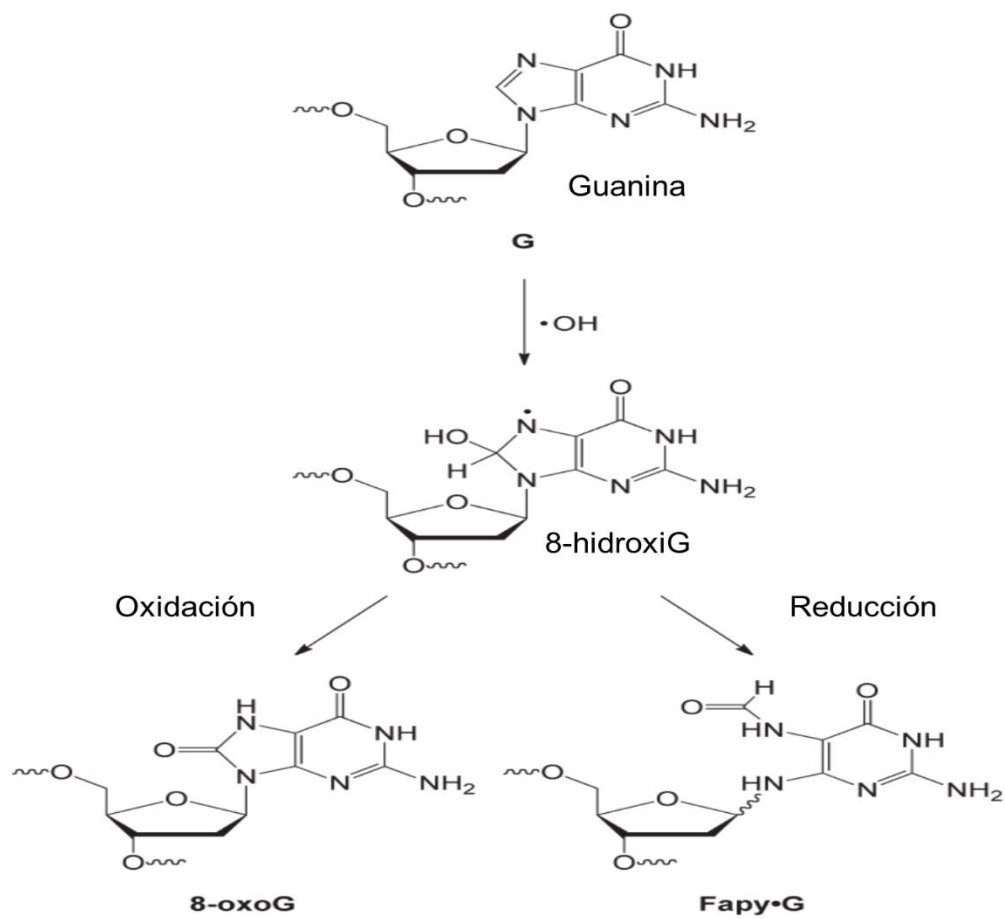


Figura 5. Modificaciones oxidativas más frecuentes de la base nitrogenada guanina (modificado de: Dizdaroglu M. 2012)⁷².

ANEXO 6

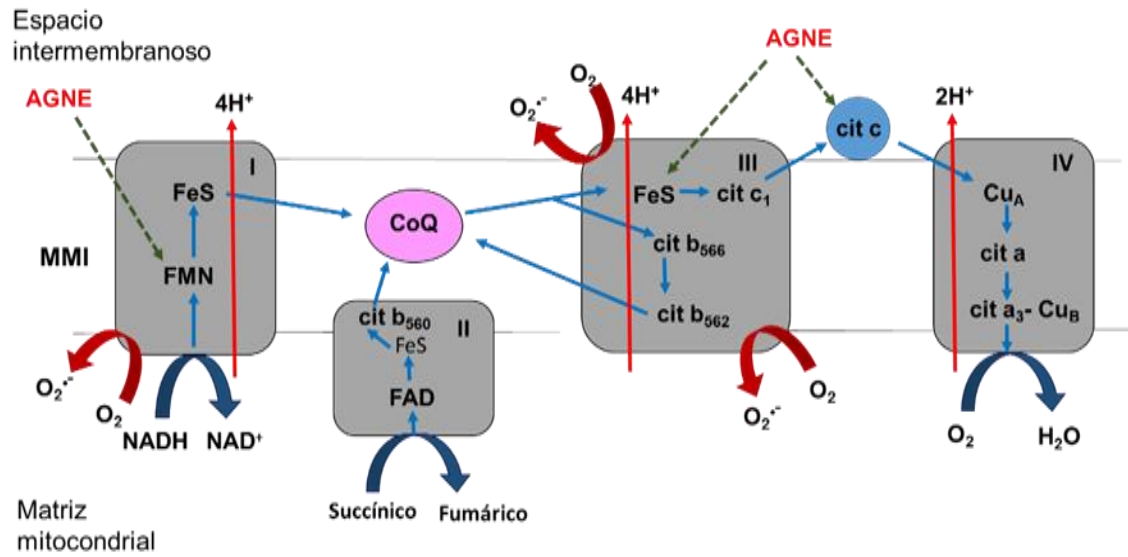


Figura 6. Producción mitocondrial de ERO inducida por los AGNE (modificado de: Schönfeld P. 2008)⁷⁴. MMI: membrana mitocondrial interna. AGNE: ácidos grasos no esterificados. CoQ: coenzima Q. FMN: flavín mononucleótido. FAD: flavín adenin dinucleótido. cit: citocromo. Cu: cobre. FeS: centro hierro-azufre. NADH: nicotin adenin dinucleótido reducido. NAD⁺: nicotin adenin dinucleótido oxidado

ANEXO 7

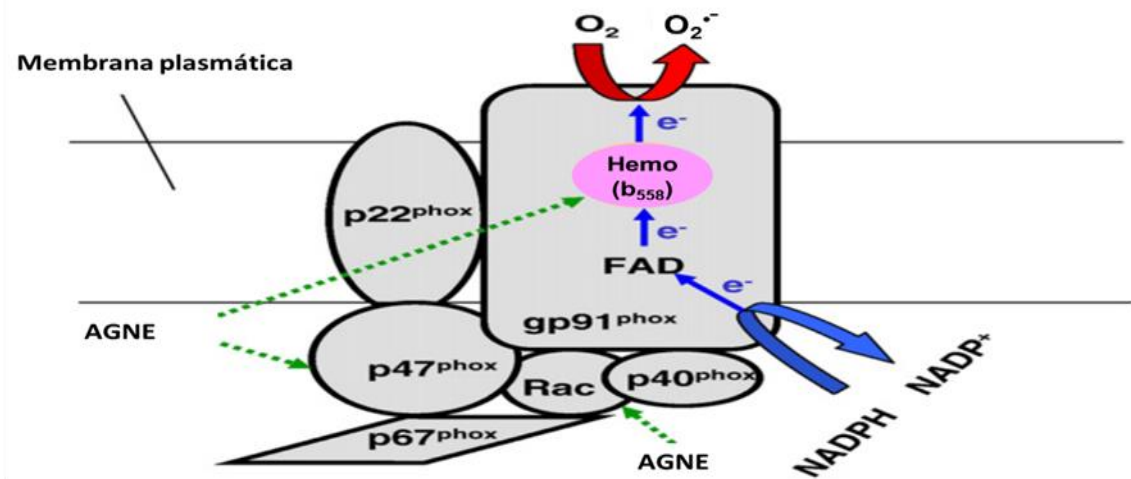


Figura 7. Producción de ERO a partir de una fuente no mitocondrial (*modificado de: Schönfeld P. 2008*)⁷⁴. Los AGNE activan al complejo multienzimático NADPH oxidasa. Se muestran las subunidades asociadas a la membrana (p22^{phox} and gp91^{phox}) y citosólicas (p47^{phox}, Rac, p40^{phox}, p67^{phox}) que forman este complejo multienzimático.

ANEXO 8

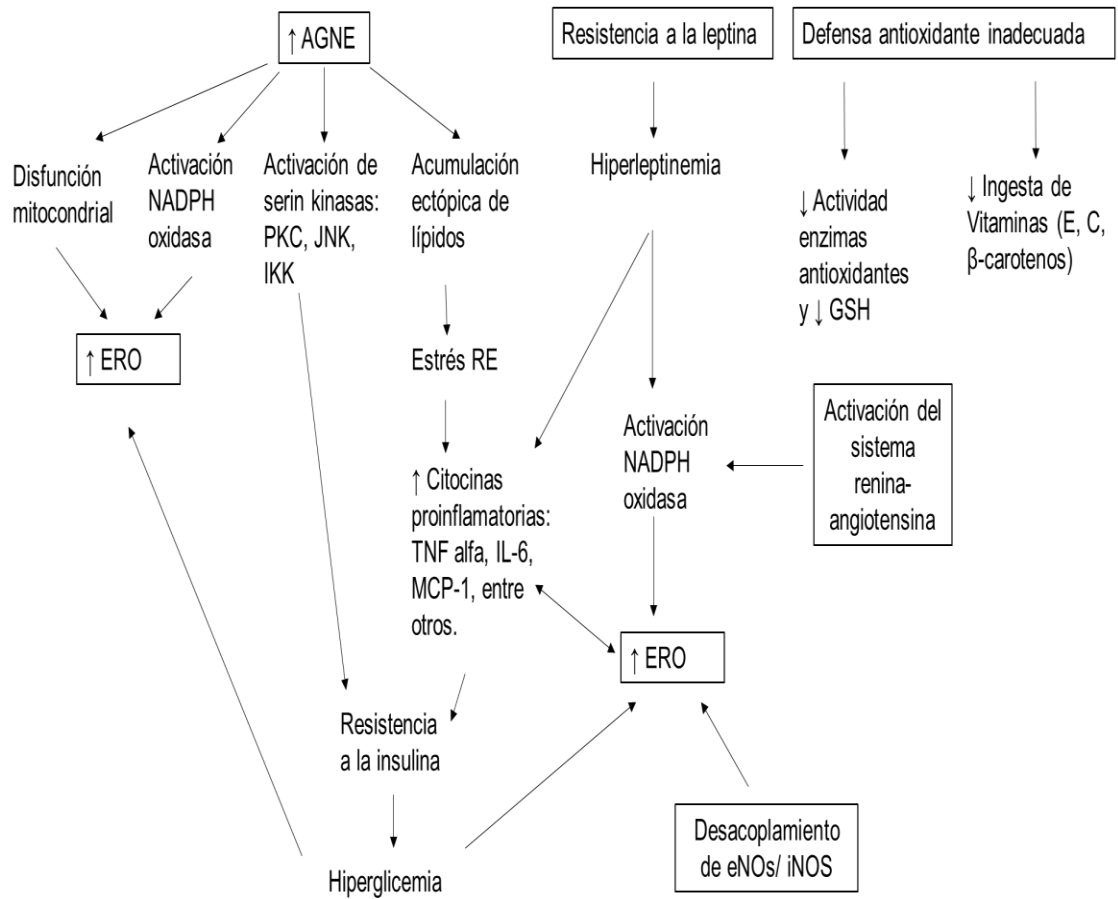


Figura 8. Mecanismos que conducen a estrés oxidativo en la obesidad. AGNE: ácidos grasos no esterificados. PKC: proteína kinasa C, JNK: kinasa del dominio N-terminal de la proteína c-Jun, IKK: kinasa del inhibidor del factor nuclear kappa B, RE: retículo endoplásmico, TNF α : factor de necrosis tumoral alfa, MCP-1: proteína 1 quimiotáctica de monocitos, IL-6: interleukina 6, GSH: glutatión reducido, eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial, iNOS: óxido nítrico sintasa inducible, ERO: especies reactivas del oxígeno, NADPH: nicotin adenin dinucleótido fosfato reducido.

ANEXO 9

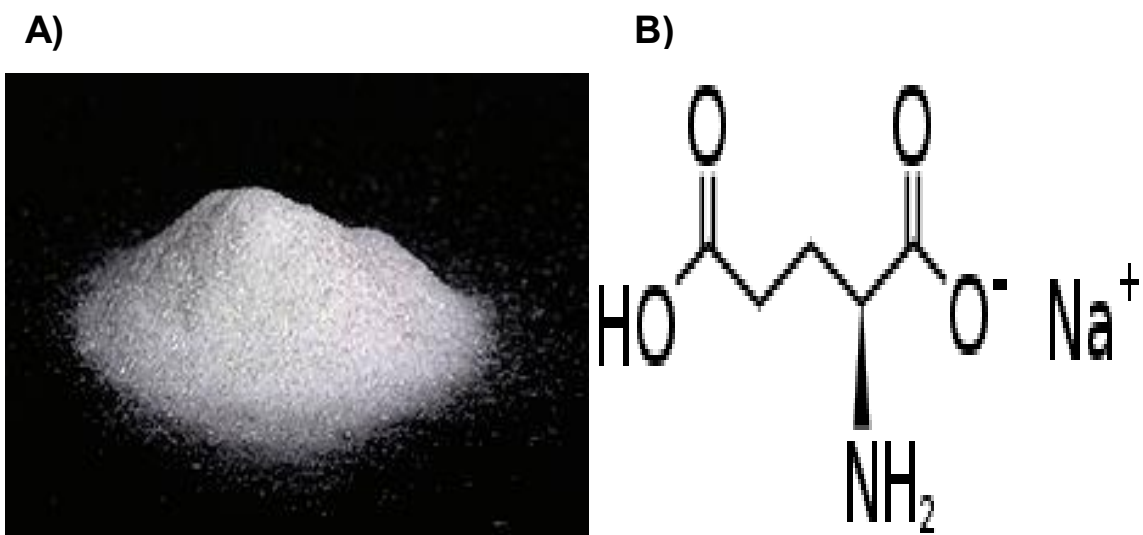


Figura 9. Glutamato monosódico (tomado de: *Wikipedia, la enciclopedia libre*). A: Estado de agregación: polvo cristalino de color blanquecino parecido a la sal o el azúcar. B: estructura química del glutamato monosódico.

ANEXO 10

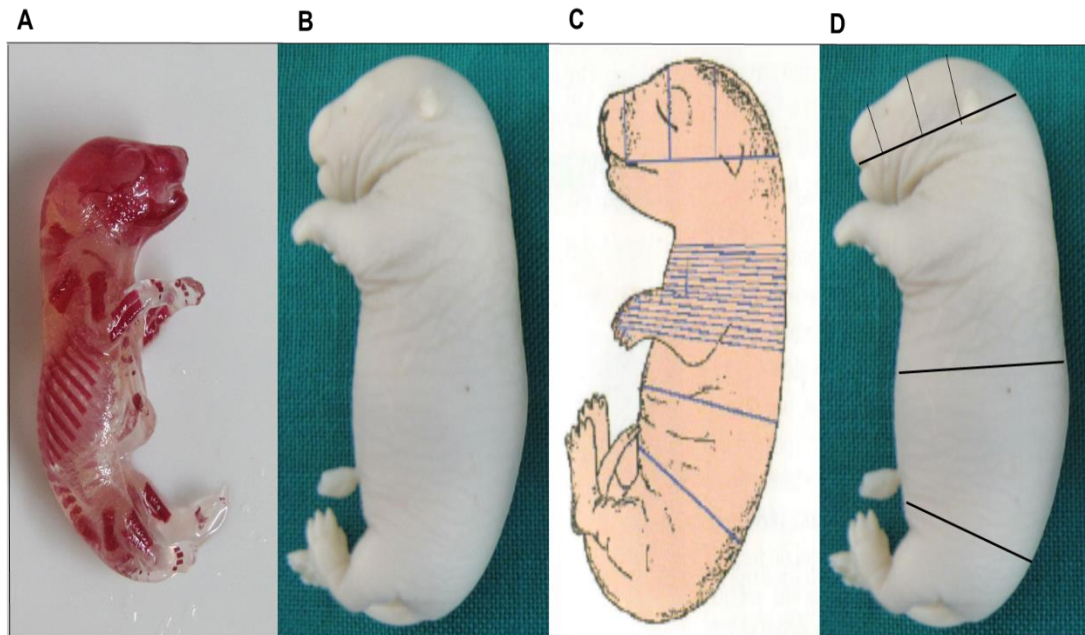


Figura 10. Fetos procesados para detección de anomalías congénitas. A: Feto procesado para análisis esquelético. Vista lateral. Se muestra la osificación fetal. B: Feto conservado en solución de Bodian para análisis visceral. C: Cortes propuestos por Wilson (tomado de Damasceno DC. 2008)³⁶. D: Representación de los cortes de Wilson realizados en esta investigación. Fotos tomadas con cámara digital (Canon)

ANEXO 11

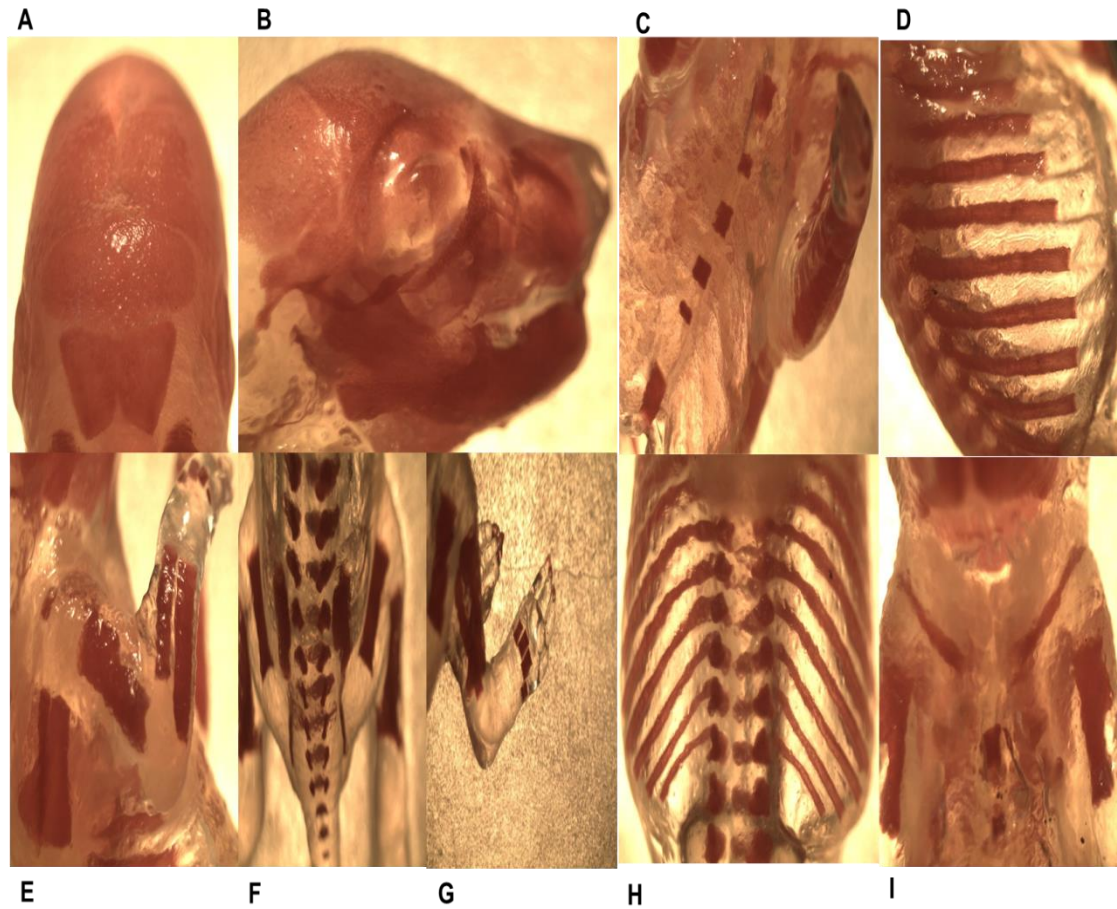


Figura 11. Osificación normal con tinción con rojo de alizarina. A y B. Cráneo. C. Esternón. D. Costillas. E. Miembro superior. F. Cintura pélvica. G. Miembro inferior. H. Columna vertebral. I. Clavículas. Fotos tomadas con cámara digital acoplada a estereocopio (Motic SMZ-143)

ANEXO 12

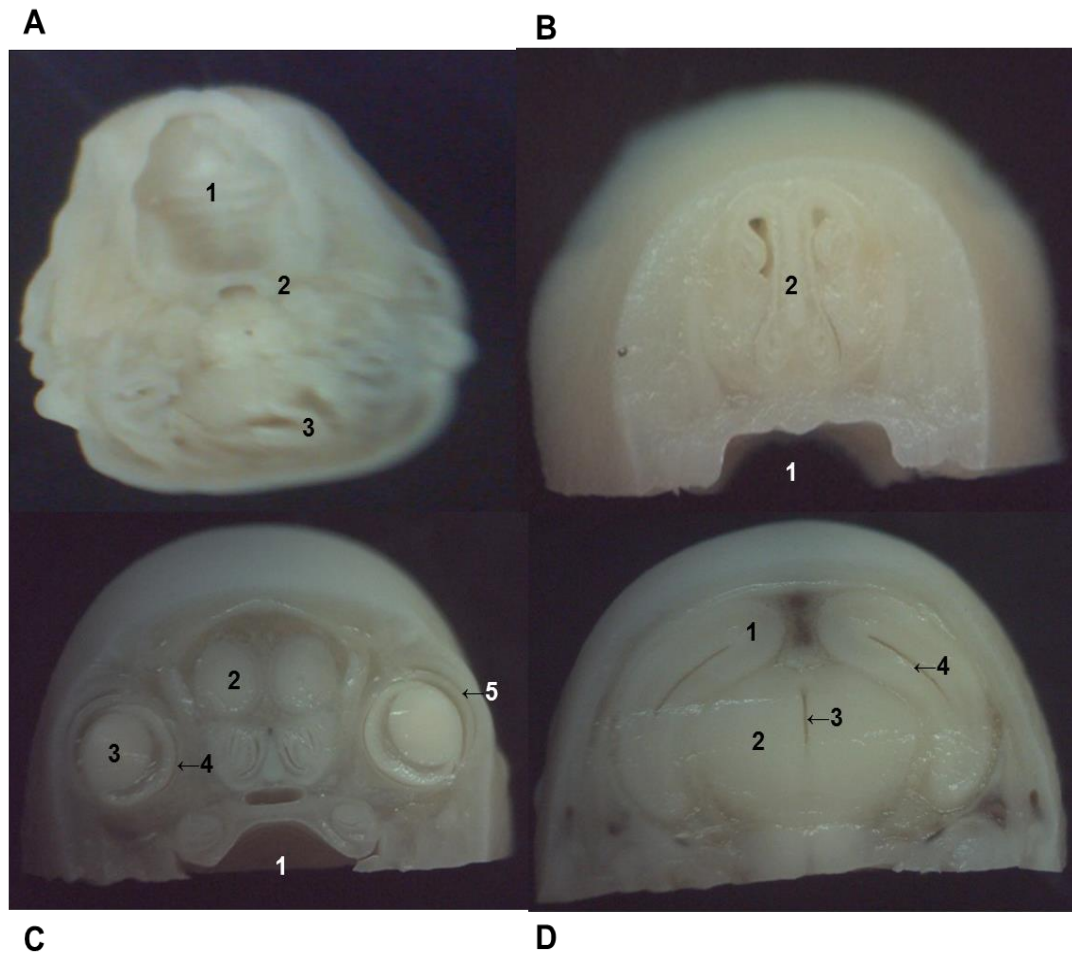


Figura 12. Cabeza. A. Corte transversal de la boca. 1: paladar, 2: tráquea, 3: canal medular. B. Corte frontal de cavidad nasal. 1: paladar, 2: septo nasal. C. Corte frontal del ojo. 1: paladar, 2: bulbo olfatorio, 3: cristalino, 4: retina, 5: cornea. D. Corte de hemisferios cerebrales. 1: hemisferio cerebral, 2: diencéfalo, 3: tercer ventrículo, 4: ventrículo lateral. Fotos tomadas con cámara digital acoplada a estereoscopio (Motic SMZ-143)

ANEXO 13



Figura 13. Diafragma, tórax y corazón. A. Vista inferior del diafragma. B. Vista anterior del tórax. 1: tráquea, 2: timo, 3: corazón, 4: pulmón. C: Vista lateral del corazón donde se observa las arterias aórtica y pulmonar. D. Corte longitudinal de corazón. 1: pulmonar, 2: aorta. Fotos tomadas con cámara digital acoplada a estereocopio (Motic SMZ-143)

ANEXO 14

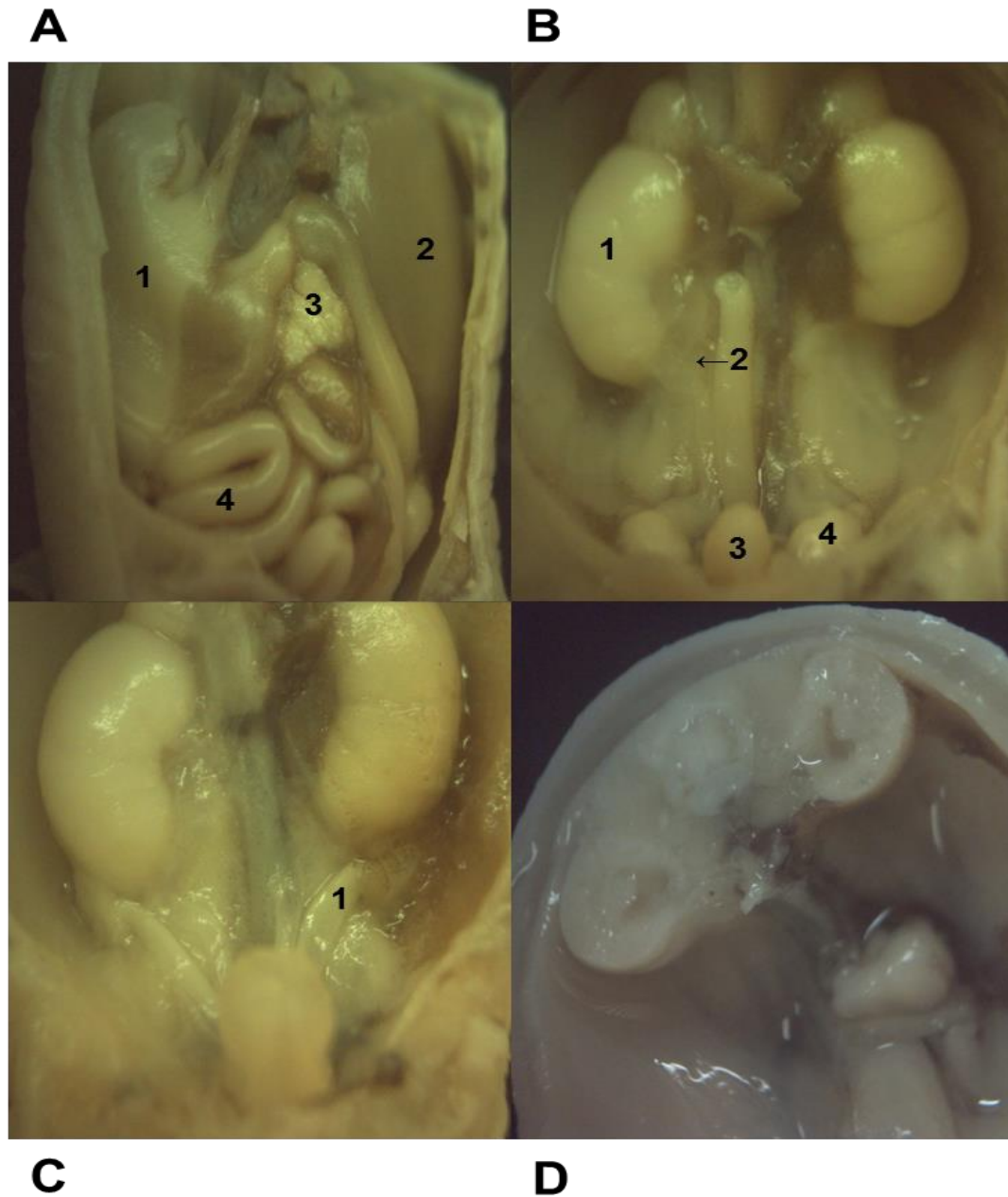


Figura 14. Abdomen. A. Visceras abdominales. 1: estómago, 2: hígado, 3: páncreas, 4: asas intestinales. B. Sistema genitourinario (macho). 1: riñones, 2: uréter, 3: vejiga, 4: testículo. C. Sistema genitourinario (hembra). 1: cuernos uterinos. D. Corte transversal de riñón. Fotos tomadas con cámara digital acoplada a estereoscopio (Motic SMZ-143)

ANEXO 15

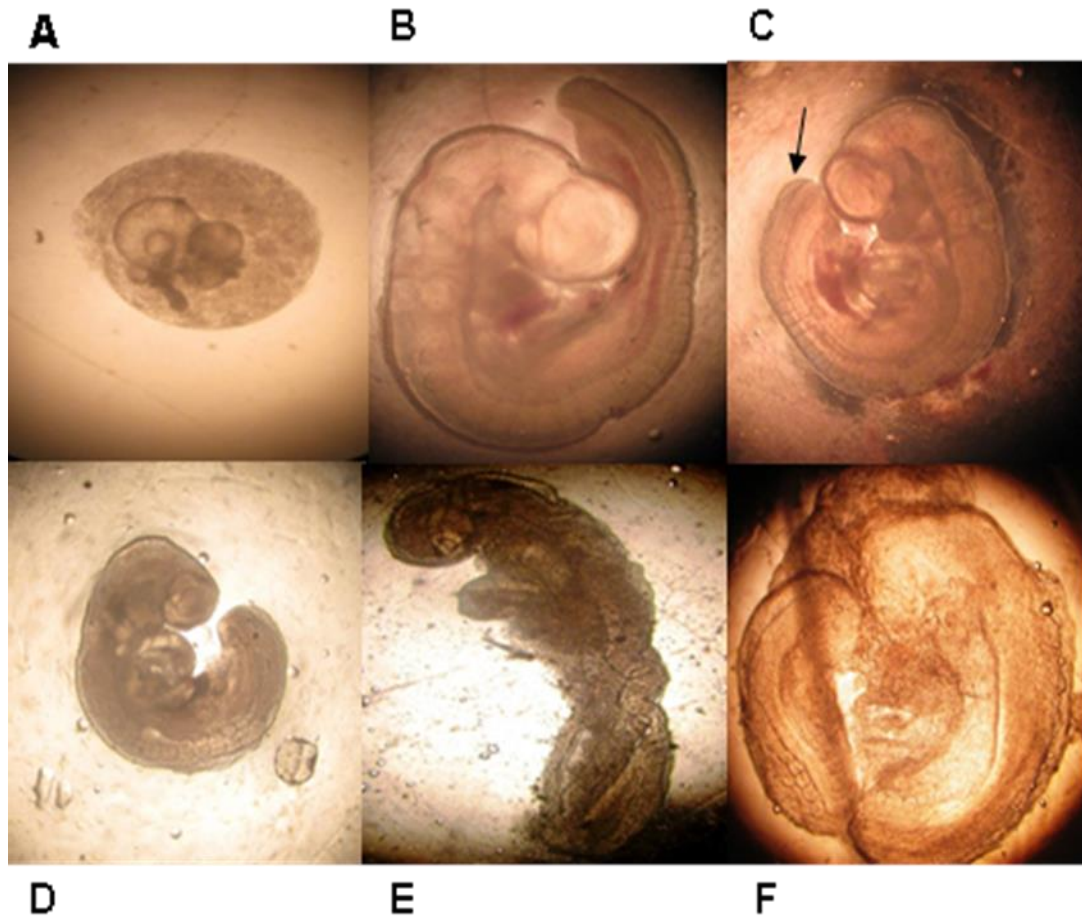


Figura 15. A: Reabsorción. B: Embrión Normal. C: Embrión Retrasado, con apertura posterior pequeña del Tubo Neural. D: Embrión Malformado con microcefalia y apertura posterior del Tubo Neural. E y F: Embriones severamente malformados. Fotos tomadas con cámara digital (Canon) acoplada a microscopio óptico 40x.

ANEXO 16

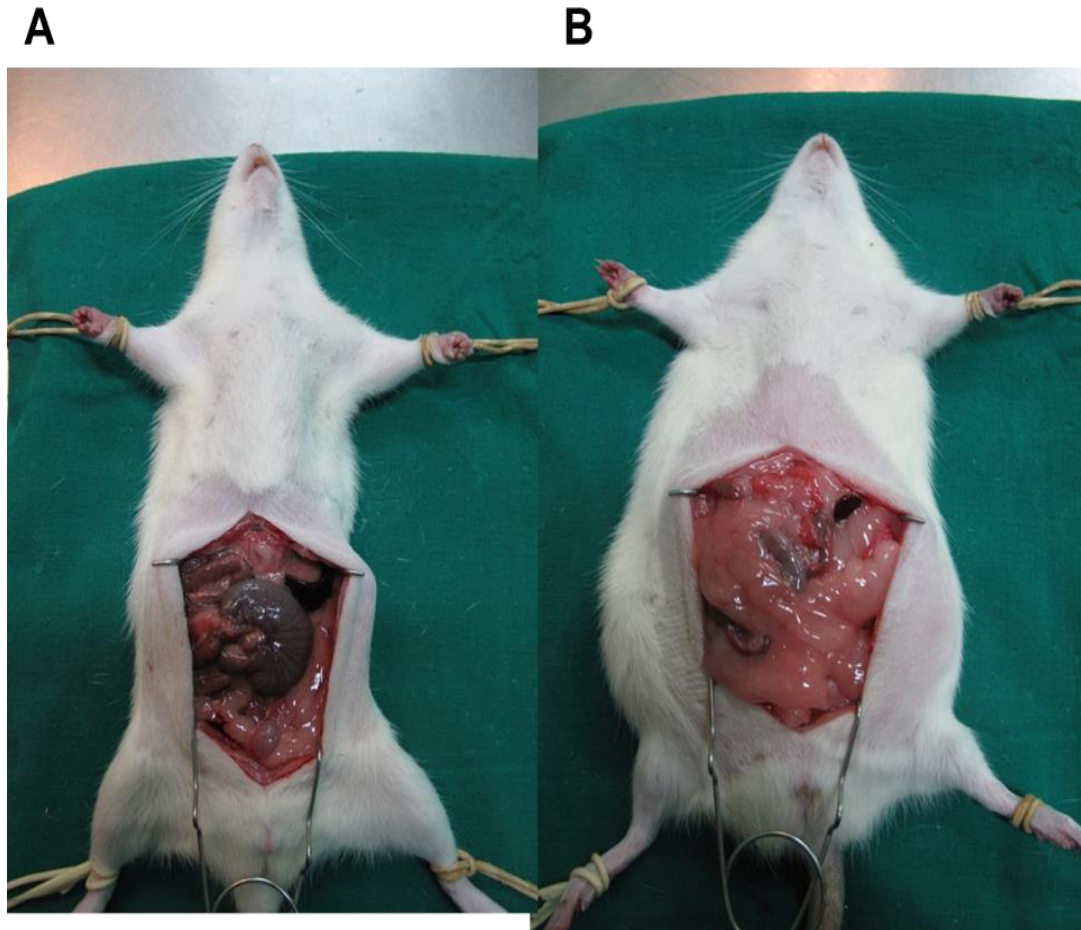


Figura 16. Fenotipo característico de la obesidad inducida por glutamato monosódico. A: Rata control. B: Rata obesa con glutamato monosódico. Nótese la hiperadiposidad central en B. Fotos tomadas con cámara digital (Canon).

ANEXO 17

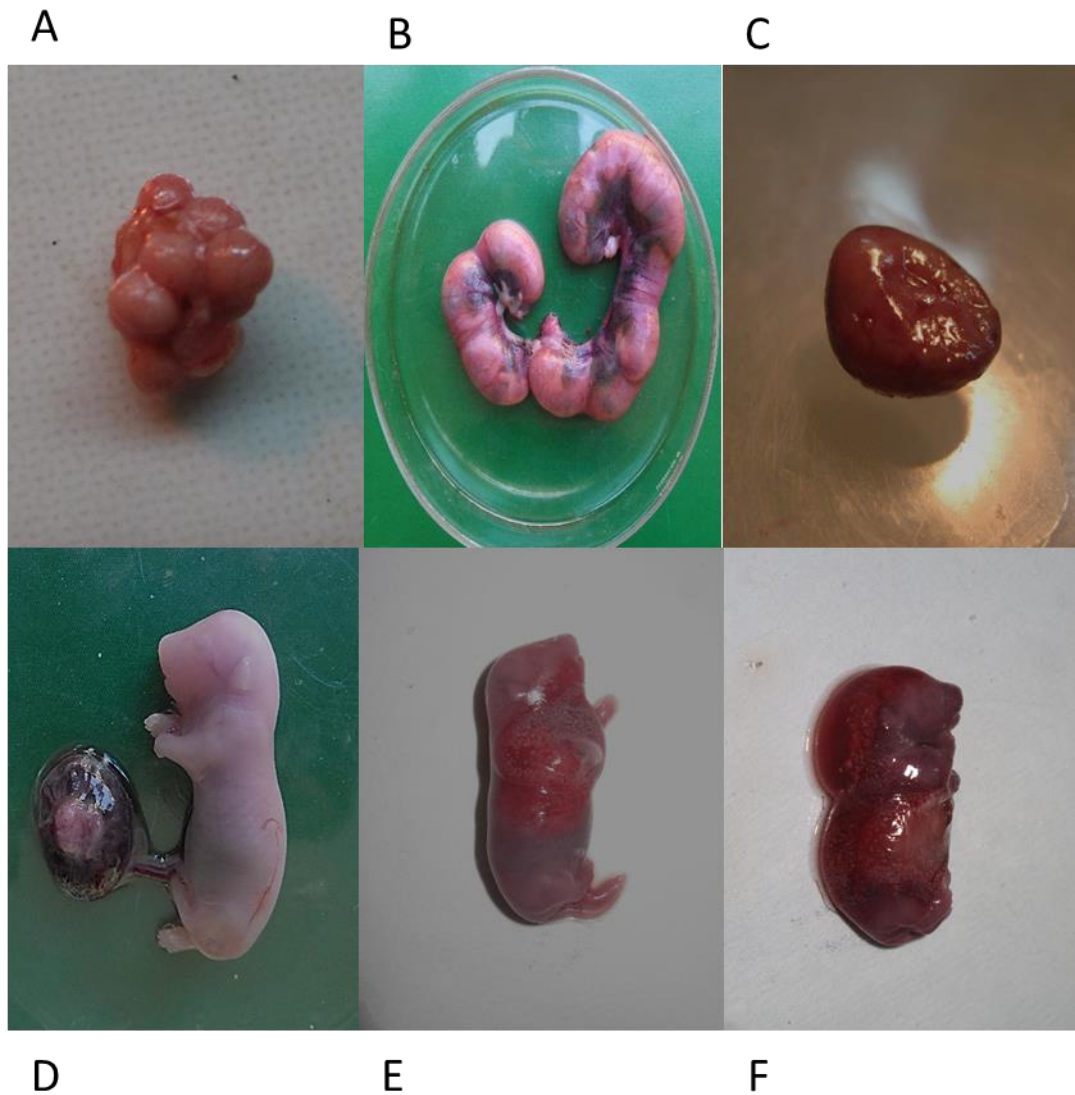


Figura 17. A: cuerpos lúteos gravídicos. B: cuernos uterinos gravídicos. C: reabsorción. D: feto vivo con su placenta. E y F: Fetos muertos. Fotos tomadas con cámara digital (Canon).

ANEXO 18

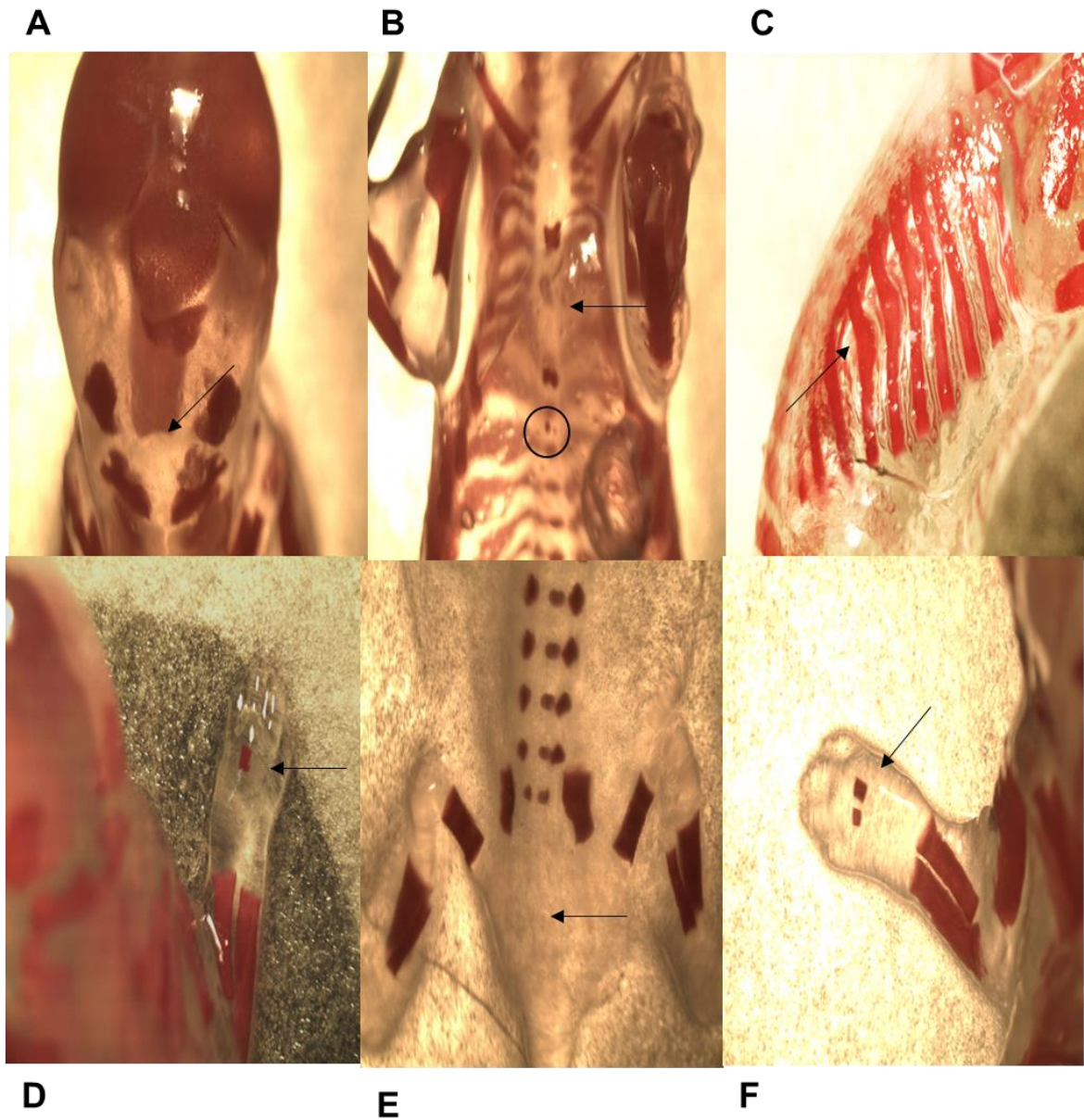


Figura 18. Anomalías esqueléticas. A: osificación incompleta del supraoccipital. B: Osificación incompleta del esternón. C: costillas arqueadas u onduladas. D: osificación incompleta de centros metatarsianos. E: ausencia de cuerpos vertebrales caudales. F: osificación incompleta de centros metacarpianos. Fotos tomadas con cámara digital acloplada a estereoscopio (Motic SMZ-143)

ANEXO 19

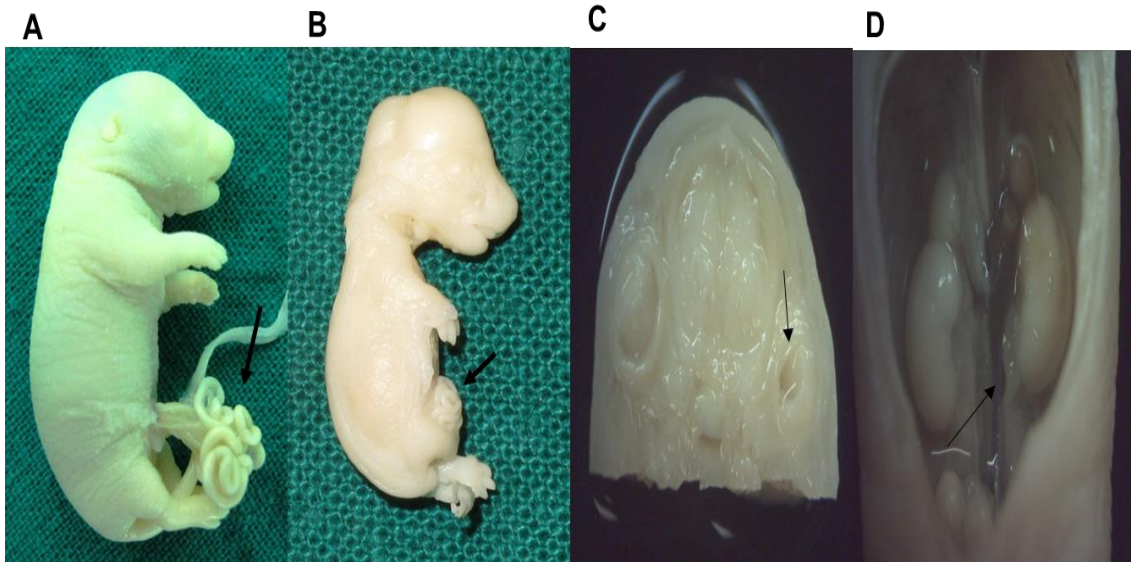


Figura 19. Anomalías viscerales. A y B: gastroquisis. Fotos tomadas con cámara digital (Canon). C: microftalmía. D: uréter acodado. C y D: fotos tomadas con cámara digital acoplada a estereocopio (Motic SMZ-143)