



FACULTAD DE FARMACIA,
CARRERA DE NUTRICIÓN Y DIETÉTICA

“EXPOSICIÓN MATERNA A UNA DIETA ALTA EN GRASA PREVIO Y DURANTE
LA PREÑEZ Y LACTANCIA, Y SUS CONSECUENCIAS EN LA FUNCIÓN
REPRODUCTIVA DE LA DESCENDENCIA”

VALERY CONSTANZA AMBROSETTI BUSTOS
MARCELO ALEJANDRO GUERRA GÁLVEZ

Tesis para optar al título de Nutricionista
Grado académico de Licenciado de Nutrición y Dietética

DIRECTOR: GONZALO CRUZ NECULPÁN PhD
INFORMANTE: RAMÓN SOTOMAYOR ZÁRATE PhD
INFORMANTE: CARINA VALENZUELA AVENDAÑO Mg

Valparaíso, 2014.

*Dedico esta Tesis a mi hija Valentina quien me dio la fuerza para buscar un mejor futuro.
A mis padres, María Teresa Bustos y Jorge Ambrosetti por su sacrificio para poder lograr
mis objetivos. A Sebastián Cid, por su apoyo y amor incondicional.*

Valery Ambrosetti B.

*A mis padres, Guillermo Guerra y Mónica Gálvez, por su constante preocupación e
incansable apoyo durante este largo proceso. Gracias por haberme dado la libertad de
encontrar mi camino.*

Marcelo Guerra G.

Agradecimientos

Agradecemos a Amanda Ramírez, Aldo Reyes, Gumercinda Olguín y Daniela Álvarez, por su gigantesca colaboración a lo largo de todo este proyecto, a Favián Uribe y a Leandro Contreras por complementar conocimientos de Morfología Ovárica.

Agradecemos también, y con especial énfasis al Dr. Gonzalo Cruz, por enseñarnos que la labor docente de un profesional puede sobrepasar el límite de la sala de clases, y por su inagotable paciencia frente a nuestra falta o exceso de carácter.

Finalmente agradecemos a Rubén y a Cesar del bioterio de la Facultad de Ciencias, al Dr. Ramón Sotomayor, Dra. Georgina Renard, Profesora Carina Valenzuela, Raúl Riquelme, Pedro Espinoza, Roxana Silva, por compartir sus conocimientos y ayudarnos con el desarrollo metodológico de nuestro trabajo.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por el Centro de Neurobiología y Plasticidad Cerebral (CNPC)

Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso.

Índice

<i>Resumen.</i>	8
<i>Abstract.</i>	10
<i>Introducción.</i>	12
Obesidad, situación epidemiológica.....	12
Programación fetal y del desarrollo.....	13
Función reproductiva de la mujer.....	14
Obesidad durante la gestación y alteraciones de la función reproductiva de la descendencia.....	17
<i>Hipótesis.</i>	19
<i>Objetivos.</i>	20
Objetivo General:	20
Objetivos Específicos:.....	20
<i>Metodología.</i>	21
1) Animales	21
2) Control de peso e ingesta diaria de alimentos.....	23
3) Apertura vaginal.....	24
4) Evaluación de la ciclicidad estral mediante frotis vaginal.....	24
5) Morfología ovárica.....	25
6) Determinación de los niveles séricos de Estradiol y Testosterona por Inmunoensayo ligado a enzima (ELISA).....	25
7) Análisis Estadístico.....	25
<i>Resultados.</i>	26
Caracterización del modelo de obesidad gestacional: Peso y función reproductiva de las madres.	26

Evaluación de parámetros metabólicos en ratas descendientes de madres obesas comparadas con controles.	28
Evaluación de parámetros reproductivos en ratas descendientes de madres obesas comparadas con controles.	31
<i>Discusión.</i>	35
Efecto de la administración de la dieta alta en grasa en las madres, previo y durante la gestación y durante el periodo de lactancia.	35
Evaluación de parámetros metabólicos en ratas descendientes de madres obesas comparadas con controles.	36
Evaluación de parámetros reproductivos en ratas descendientes de madres obesas comparadas con controles.	39
<i>Conclusiones.</i>	42
<i>Referencias.</i>	43
<i>Anexos.</i>	50

Resumen.

La obesidad es un problema de salud a nivel mundial debido a su relación con múltiples patologías que afectan al organismo. La prevalencia de obesidad en mujeres en edad fértil es muy alta y se relaciona con diversos efectos reproductivos como infertilidad, abortos espontáneos y dificultad de concebir al momento del parto. Por otra parte, la obesidad gestacional predispone a la descendencia a diversas alteraciones tanto metabólicas como reproductivas. Basándonos en la literatura existente hemos planteado la hipótesis de que la obesidad inducida por la dieta previo y durante la gestación y durante la lactancia programa alteraciones en el desarrollo folicular ovárico y esteroidogénesis de la descendencia en ratas. El siguiente estudio tiene como objetivo principal evaluar la función ovárica y reproductiva en ratas hembras descendientes de madres alimentadas con una dieta alta en grasa. Se evaluó el peso corporal e ingesta de alimentos a ratas madres e hijas. El inicio de la pubertad se determinó mediante la observación de la apertura vaginal. Además se realizó frotis vaginal diario. Por medio de morfología ovárica se evaluó cantidad de folículos antrales sanos, atrésicos y cuerpos lúteos. Las hormonas fueron determinadas por ELISA. Todos los análisis estadísticos se realizaron con t de Student de una cola ($p < 0.05$). Nuestros resultados muestran que hijas de madres obesas presentan un mayor peso que controles, diferencia que se mantiene hasta el día posnatal 60. Además, observamos hiperfagia, adelanto de la pubertad, disminución en la cantidad de folículos antrales y atrésicos, presencia de estructuras similares a quistes ováricos, un aumento del estradiol y disminución de la testosterona sérica.

Por lo tanto, la obesidad durante la gestación y lactancia genera alteraciones metabólicas y reproductivas en la descendencia. Creemos que estos efectos pueden ser aún más dañinos a un mayor plazo lo que hace necesario seguir investigando al respecto.

Abstract.

Maternal exposure to a high-fat diet prior and during pregnancy and lactation and its consequences on reproductive function of the offspring.

Obesity is a worldwide health problem because it is related to several diseases that affect the body function. The prevalence of obese woman in reproductive age is very high and has been related to different reproductive effects including infertility, miscarriage and difficulties during labor. In addition to these problems has been described that gestational obesity predisposes offspring to several metabolic and reproductive disorders. Based on the literature we hypothesized that diet induced obesity before and during pregnancy and during lactation programs alterations in ovarian follicular development and steroidogenesis in rat offspring. The main objective of our study was to evaluate the ovarian and reproductive function in female rat offspring of mothers fed a high fat diet. Body weight and food intake of dams and female pups was evaluated. The onset of puberty was determined by observation of the vaginal opening. Estrual cyclicity was determined by vaginal smear observation. Healthy and atretic antral follicles and corpora lutea were counted. Sex hormones were determined by ELISA. All statistical analyzes were performed using 1-tail Student's test ($p < 0.05$). Our results show that the female pups from obese mothers have a higher weight than controls pups, and this difference is maintained until postnatal day 60. We further note hyperphagia, early puberty onset, decreased amount of healthy and atretic antral follicles at postnatal day 60, presence of structures similar to ovarian cysts, a decrease in testosterone levels, and increased estradiol levels.

We concluded that obesity during pregnancy and lactation programs metabolic and reproductive alterations in the offspring. We believe that these effects may be even more harmful in long term, so further studies will be needed to demonstrate it.

Introducción.

Obesidad, situación epidemiológica.

La prevalencia de obesidad está aumentando rápidamente alrededor del mundo, especialmente en áreas urbanas, sin distinción entre países ricos y pobres, en todos los sectores de la sociedad y se espera que continúe en ascenso[1].

Se estima que 1 de cada 5 adultos estadounidenses son obesos con un índice de masa corporal (IMC) $> 30 \text{ kg/m}^2$ [2], siendo a nivel mundial la población con niveles de obesidad más alarmantes.

En Chile, las cifras son similares, 25,1% de la población es obesa, existiendo una mayor prevalencia en mujeres con un 30,7%, superando al género masculino. Para el año 2010 nuestra población presentó un exceso de peso a nivel nacional de 67%. Estas cifras son inversamente proporcionales al nivel socioeconómico y nivel educacional, en donde se observa que a menor nivel educacional la obesidad llega a un 35,5 % para ambos sexos, cifra que se considera va en aumento cada año[3].

La obesidad es definida como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud[4]. A nivel mundial se estima que cada año 2,8 millones de personas fallecen por consecuencias asociadas al sobrepeso u obesidad, sumado a esto, cifras mundiales del año 2010 señalan que alrededor de 40 millones de niños menores de cinco años de edad tenían sobrepeso u obesidad[4].

El exceso de peso es actualmente uno de los factores predisponentes de mayor alerta epidemiológica mundial, puesto que conlleva a un desequilibrio metabólico y por consiguiente a presentar enfermedades crónicas como Diabetes Mellitus tipo II,

Hipertensión Arterial, Dislipidemia y Síndrome Metabólico. En adición, la obesidad conduce a un impacto negativo en la función reproductiva especialmente en mujeres, como disminución de la función gonadal, hiperandrogenismo, infertilidad, aumento de intentos fallidos de fertilización *in vitro* y aumento de los abortos espontáneos en el primer trimestre de embarazo[5].

En embarazadas los datos son similares, ya que más del 50% de las gestantes en control en el Sistema Nacional de Servicio de la Salud (SNSS) presenta algún grado de sobrepeso u obesidad. En los últimos 15 años la prevalencia de obesidad se ha más que duplicado e inversamente la prevalencia de mujeres de bajo peso se ha reducido a la mitad[6].

En las últimas décadas se ha identificado a la obesidad como uno de los principales factores de riesgo en el embarazo, conllevando un riesgo importante al feto durante la primera etapa gestacional. Aun así existen escasos estudios en nuestro país que relacionen la obesidad materna con el riesgo reproductivo, con excepción de unos pocos en los cuales se ha visto una relación entre la obesidad materna y mayor asistencia en el parto, presencia de diabetes gestacional (aumentando el riesgo de macrosomía, obesidad en la niñez, y diabetes en la adultez) y un peso de nacimiento mayor a 4000 g. Agregado a esto se pudo evidenciar mortalidad tardía de los hijos cuyas madres presentaron un aumento de peso en el embarazo superior a los 14 kilos[7].

Programación fetal y del desarrollo.

Cuando la exposición a un estímulo o injuria en etapas tempranas de la vida, durante periodos sensibles o críticos, resulta en cambios permanentes o a largo plazo en la estructura o función del organismo, nos estamos refiriendo al concepto de programación

fetal o “programming”[8]. En este contexto, está ampliamente descrito que la desnutrición materna durante el embarazo producirá hiperfagia, resistencia a la insulina, hipertensión y obesidad en la descendencia[9, 10], efectos que se ven amplificados cuando se administra una dieta alta en grasa en el período postnatal[10-12]. En contraste a estos resultados, también existe amplia evidencia de que la obesidad materna durante el embarazo y la lactancia, producirá efectos similares a los causados por la desnutrición[13]. Modelos en animales demuestran que las crías de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa presentan aumento en la presión sanguínea[14] e hiperfagia[15]. También se ha evidenciado que la descendencia muestra un mayor peso al nacer que las crías alimentadas con una dieta control[16, 17] y un aumento en el peso corporal durante la infancia[18] y la adultez[15, 17]. Sumado a esto, las crías de madres expuestas a una dieta alta en grasa durante la preñez presentan mayor cantidad de masa grasa comparado con controles[18-20], y niveles alterados de glucosa en sangre y en el perfil lipídico[19, 21, 22], destacando que todos estos parámetros forman parte de los criterios de inclusión para el diagnóstico de Síndrome Metabólico. Es importante mencionar que la mayoría de estos parámetros se ven notablemente aumentados si las crías continúan con una dieta post natal alta en grasa.

Función reproductiva de la mujer.

La función ovárica reproductiva contempla 2 procesos fundamentales; *foliculogénesis* y *esteroidogénesis*. La foliculogénesis corresponde al desarrollo de los gametos femeninos dentro de estructuras glandulares llamadas folículos ováricos, los que van avanzando secuencialmente en distintos estadios de maduración hasta el momento de la ovulación.

La esteroidogénesis corresponde a la síntesis y secreción de hormonas de naturaleza esteroidea, que son liberadas desde los folículos hacia la sangre, con el objetivo de estimular y controlar la función de diversos órganos reproductivos[23].

El desarrollo folicular comienza durante la vida fetal con la formación de los *Folículos Primordiales* alrededor de la semana 22-24 de gestación, proceso conocido como ensamblaje folicular. Estos folículos, conocidos también como la reserva folicular ovárica, están compuestos de un ovocito y células epiteliales planas (células de pregranulosa). Cuando la mujer alcanza la madurez reproductiva, en cada ciclo se reclutan folículos primordiales para comenzar a desarrollarse a través de distintos estadios de desarrollo. Entonces los folículos primordiales se diferencian en *Folículos Primarios* los cuales presentan células de granulosa cúbicas. Posteriormente, estas células de granulosa forman un epitelio estratificado formando el *Folículo Secundario*. Luego se forman la segunda capa de células somáticas por debajo de la membrana basal, llamadas células de la teca. Después de la aparición de las células de la teca, se forma una cavidad entre las células de granulosa que tiene el nombre de antro. En este estadio los folículos tienen nombre de *Folículos Antrales*. Cabe destacar que en las células de granulosa se produce mayoritariamente estradiol, mientras que en las células de teca se sintetizan andrógenos. El crecimiento de estos folículos depende de la Hormona Folículo Estimulante (FSH). Al final del ciclo menstrual los folículos antrales de gran tamaño son seleccionados para empezar un desarrollo rápido dependiente de gonadotropinas (FSH y Hormona Luteinizante (LH)). El *Folículo Dominante* o *de Graaf* es el más grande y con más receptores de FSH. Este folículo a la mitad del ciclo se convierte en *Folículo pre-ovulatorio* que posteriormente

responde ante una elevación de la concentración plasmática de LH liberando el óvulo. Las células de la teca y granulosa comienzan a sufrir un cambio que lleva a la formación del *Cuerpo Lúteo*, en donde la cavidad antral se llena de sangre y da origen al cuerpo hemorrágico. Este cuerpo lúteo tiene una vida de 14 días y está preparado para producir Progesterona y así mantener la implantación del óvulo fecundado, esta fase es denominada Fase Lútea. Cabe señalar que los folículos antrales que no son seleccionados sufren apoptosis, y se denominan *Folículos Atrésicos*[23]. Para revisión de las diversas estructuras foliculares ver **Figura 1**.

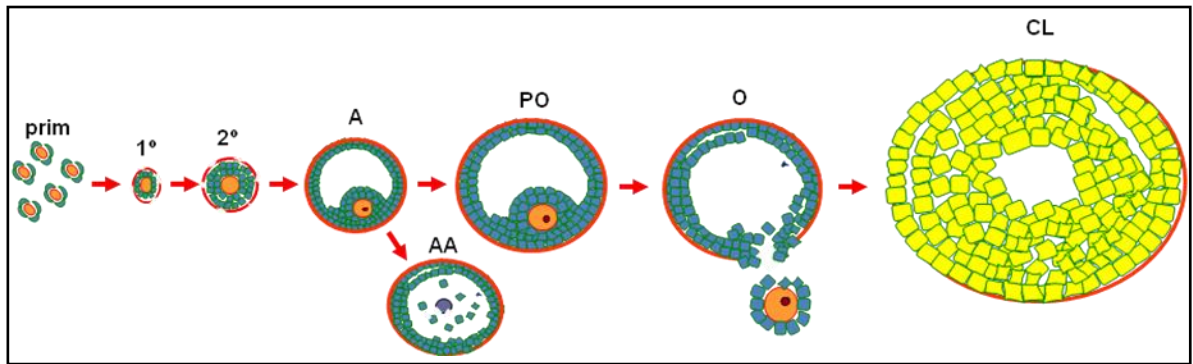


Figura 1: Desarrollo Folicular. Se muestran folículos en distintas etapas del desarrollo Folicular. Folículos primordiales (prim), Folículos primarios (1°), Folículos secundarios (2°), Folículos antrales (A), Folículos antrales atrésicos (AA), Folículos preovulatorios (PO), Ovulación (O) y Cuerpo Lúteo (CL).

En cada ciclo de la mujer o la rata ocurre reclutamiento y selección de folículos ováricos que cuando crecen producen una gran cantidad de hormonas esteroidales, particularmente Estradiol. Estas variaciones cíclicas del Estradiol producen cambios en los tejidos blancos como tejido mamario y endometrio entre otros. Cuando ocurre la ovulación las estructuras remanentes se transforman en cuerpos lúteos que producen grandes cantidades de la hormona progesterona, que también produce efectos en diversos tejidos reproductivos. Las

variaciones que se producen tanto en la ciclicidad estral como menstrual se deben a variaciones en los niveles plasmáticos en estas hormonas[24].

Nuestro modelo experimental corresponderá a la rata, la cual tiene ciertas diferencias en su ciclo reproductivo con la mujer. En la **Tabla 1** se muestran importantes diferencias que ocurren en el proceso de desarrollo folicular en la mujer comparado con la rata.

Tabla 1: Diferencias en el desarrollo folicular entre la mujer y la rata.

	Mujer	Rata
Ensamblaje Folicular.	Ocurre entre la semana 22 a 24 de gestación.	Ocurre en los primeros días de desarrollo postnatal (entre día 1 y 3 de vida).
Cantidad de Cuerpos Lúteos en ovario.	1, las mujeres son monoovulatorias.	Alrededor de 40, las ratas son poliovulatorias.
Duración del Ciclo Reproductivo.	En la mujer existe un Ciclo Menstrual que dura alrededor de 28 días.	En la rata existe un Ciclo Estral que dura alrededor de 4 días.

Obesidad durante la gestación y alteraciones de la función reproductiva de la descendencia.

Aunque la evidencia en humanos es escasa, las alteraciones de la función reproductiva en la descendencia como consecuencia de la obesidad durante la preñez en modelos animales han sido ampliamente estudiadas en los últimos años. La mayoría de estos estudios coinciden en que una dieta alta en grasa durante la preñez produce un inicio anticipado de la pubertad[25], evento que se inicia incluso antes cuando las crías también se exponen a una dieta alta en grasa, independiente de la alimentación de la madre[26-28]. Dentro de la poca evidencia en humanos, resultados similares se obtuvieron en un estudio de seguimiento retrospectivo que examinó la relación entre el índice de masa corporal (IMC) de las madres

antes del embarazo y el inicio de la pubertad de sus hijas, encontrando que la obesidad materna se asocia con un aumento la probabilidad de presentar menarquia antes de los 12 años[29].

Otra de las consecuencias ya descritas de la obesidad durante la preñez, son las alteraciones en la ciclicidad estral de las ratas. Evidencia en ratas indica que las crías de madres expuestas a una dieta alta en grasa en los períodos previo y durante la preñez presentaron irregularidades en el ciclo estral, y el porcentaje de ratas con irregularidades es mayor, si éstas se alimentaban con una dieta alta en grasa en el período post natal[26, 30]. Complementario a esto, las crías que continuaron con la dieta alta en grasa, mostraron ciclos más prolongados, o presencia de estro persistente [26].

El desarrollo de una pubertad precoz y las alteraciones en la ciclicidad estral de las ratas descendientes de madres que fueron obesas durante la gestación nos lleva a pensar que existen alteraciones de la función ovárica (Folículoogénesis y Esteroideogénesis) que pueden ser permanentes.

De acuerdo a la evidencia expuesta, planteamos la siguiente hipótesis:

Hipótesis.

La Obesidad inducida por una dieta alta en grasa previo y durante la gestación y lactancia programa alteraciones en el desarrollo folicular ovárico y la esteroidogénesis ovárica de la descendencia en ratas.

Objetivos.

Objetivo General:

- Evaluar tanto la función ovárica como índices de función reproductiva en ratas hembras descendientes de madres alimentadas con una dieta alta en grasa en comparación con ratas cuyas madres fueron alimentadas con dieta control.

Objetivos Específicos:

- Determinar el inicio de la vida reproductiva y evaluar la ciclicidad estral de ratas hijas de madres alimentadas con dieta alta en grasa comparado con ratas controles que corresponden a hijas de madres alimentadas con dieta control.
- Evaluar diferencias en el peso corporal y en la ingesta de alimentos de ratas descendientes de madres alimentadas con dieta alta en grasa comparado con ratas controles.
- Determinar la cantidad de folículos antrales, folículos antrales atrésicos y cuerpos lúteos de ovarios de ratas hembras descendientes de madres alimentadas con una dieta alta en grasa comparado con ratas controles.
- Determinar la concentración sérica de Estradiol y Testosterona en la descendencia de madres alimentadas con dieta alta en grasa comparado con ratas controles.

Metodología.

1) Animales

Se usaron 12 ratas Sprague Dawley de 200-250g de peso que fueron separadas en dos grupos experimentales: 6 ratas con dieta control (Dieta Champion: 23% Proteína, 64% Hidratos de Carbono, 13% Lípidos, equivalentes a 4 Kcal/g) y 6 con dieta alta en grasa (High Fat: HF, Research Diet™ USA; 20% Proteína, 20% Hidratos de Carbono y 60% Lípidos, equivalentes a 5 Kcal/g). Los animales tuvieron acceso a agua y comida *ad libitum* y se mantuvieron en una sala con temperatura controlada y con un ciclo día noche de 12:12 horas. Los animales permanecieron durante 6 semanas en el bioterio de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso. Las 3 primeras semanas se controló el peso corporal y la ciclicidad estral y los dos grupos fueron expuestos a dieta control. Las siguientes 4 semanas se mantuvieron con una dieta control y/o HF. Al finalizar las 4 semanas, se cruzaron las hembras en etapa Proestro del ciclo estral con machos reproductores alimentados con dieta control. Las hembras cuya preñez no fue exitosa fueron nuevamente cruzadas. La confirmación de la preñez se realizó mediante frotis vaginal en el cual se pretendía observar la presencia de espermatozoides. Las ratas cuya preñez fue exitosa permanecieron con su dieta original (control o HF) durante el periodo de gestación. Una vez nacidas las crías se mantuvieron con sus respectivas nodrizas con dieta control o HF hasta los 21 días de edad y luego se separaron en grupos control o HF según correspondía. Las crías se sexaron al finalizar el periodo de lactancia y sólo las hembras se usaron para los análisis posteriores al destete. Ambos grupos fueron alimentados con una dieta Control *ad libitum* después del destete. Al finalizar el período de lactancia, las ratas

madres se sacrificaron por decapitación y las crías fueron sacrificadas por el mismo método, a los 60 y 120 días de edad. Los animales de experimentación permanecieron con ciclos de día:noche de 12:12 horas, y alimento y agua ad-libitum en una sala de mantención de animales con temperatura y humedad controlada. Al momento de la eutanasia se extrajeron y pesaron algunos órganos tales como útero, músculo, ovarios e hígado. Todos los procedimientos experimentales han sido aprobados por el comité de Bioética de la Universidad de Valparaíso y el comité de Bioética de la Comisión Nacional de Investigación, Ciencia y Tecnología (CONICYT).

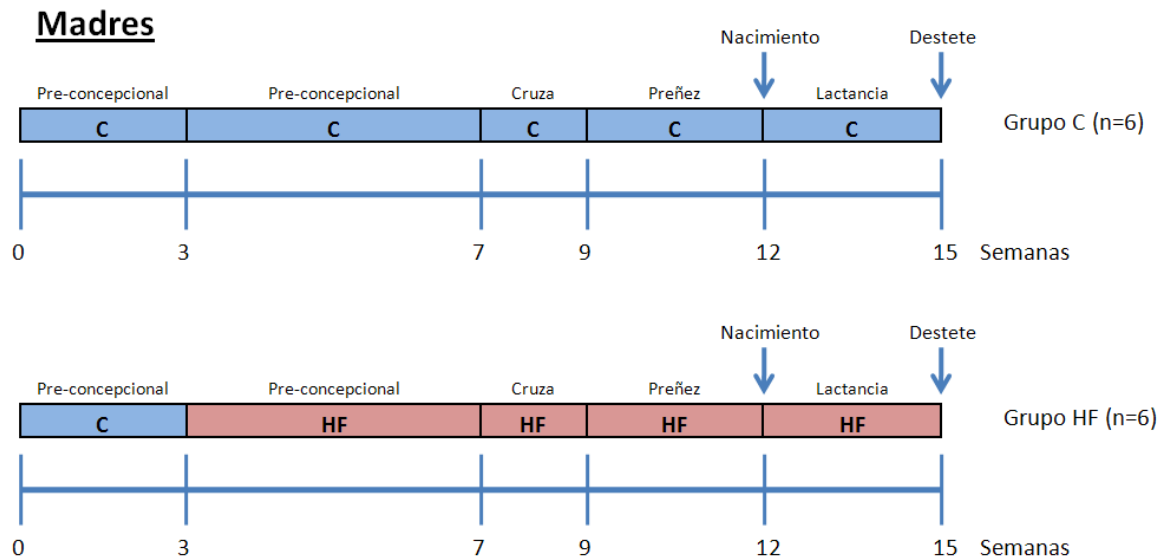


Figura 2. Diseño experimental de las ratas madres.

Crías

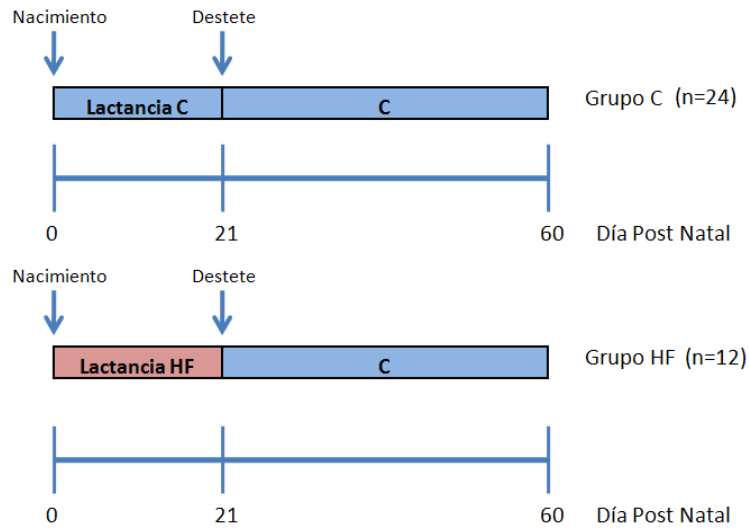


Figura 3. Diseño experimental de la descendencia.

2) Control de peso e ingesta diaria de alimentos.

Se tomó registro diario del peso de las ratas madres durante 4 semanas previo a la cría, durante la gestación y lactancia. Debido a la poca disponibilidad de espacio en el bioterio, solo se dejaron 3 madres control y 4 madres HF para el periodo de preñez, pero 2 de estas últimas presentaron complicaciones durante el parto por lo cual fueron excluidas del grupo HF durante la gestación y la lactancia. En consecuencia, durante estos periodos solo se hablará de tendencias, ya que no cumplen el número de muestra mínimo para un análisis estadístico. Las crías fueron pesadas diariamente desde su nacimiento hasta el día posnatal 60. Se registró la cantidad de alimento consumido por grupo experimental y se controló diariamente mediante el pesaje.

3) Apertura vaginal.

Se determinó la edad de inicio de la pubertad mediante observación de apertura vaginal a todas las crías (Grupo control o HF). La apertura vaginal en ratas ocurre en promedio entre los días 30 a 50 de vida y depende de cada bioterio y de las distintas condiciones ambientales. Se evaluó este inicio de pubertad mediante el criterio descrito por *Lewis E. et al, 2002*[31].

4) Evaluación de la ciclicidad estral mediante frotis vaginal.

El registro diario de ciclicidad estral fue realizado a contar de la fecha de apertura vaginal de los animales y fue basado en las características citológicas que adopta el epitelio vaginal por efecto de los niveles circulantes de hormonas sexuales [32].

- **Proestro:** Etapa del ciclo estral de la rata de duración entre 12 a 24 horas y que citológicamente se caracteriza por presencia de células epiteliales nucleadas, bien redondeadas y solo algunas escamosas de forma irregular.
- **Estro:** Etapa del ciclo estral de la rata de duración entre 24 a 48 horas. Es el periodo de receptividad sexual por el macho. Citológicamente se caracteriza por presencia de células escamosas (con citoplasma granular), de forma irregular y agrupadas.
- **Metaestro o Diestro 1:** Duración de 12 a 24 horas. Presencia en frotis de leucocitos y células escamosas.
- **Diestro 2:** Etapa del ciclo estral con una duración aproximada de 48 horas y con alta presencia en el frotis de leucocitos.

5) Morfología ovárica.

Una vez extraídos los ovarios fueron inmersos inmediatamente en el fijador Bouin (mezcla formada por *p*-formaldehído al 37-40%, ácido pícrico saturado y ácido acético glacial), donde permanecieron por 6-48 horas y luego fueron lavados en etanol 70% por 24 horas. Después del procedimiento de fijación, los ovarios fueron incluidos en parafina, cortados a un grosor de 6µm, montados en portaobjetos y sujetos a tinción con hematoxilina-eosina. Se analizaron todos los cortes histológicos de cada ovario y se realizó el recuento total de Cuerpos Lúteos, Folículos Antrales Sanos y Folículos Antrales Atrésicos según los criterios descritos anteriormente [33, 34].

6) Determinación de los niveles séricos de Estradiol y Testosterona por Inmunoensayo ligado a enzima (ELISA).

Se realizó la determinación de las hormonas a todas las crías mediante el análisis de una muestra de sangre obtenida al final del estudio (60 días de edad). Los niveles de Estradiol (E₂) y Testosterona (T) se determinaron por ELISA de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Alpco Diagnostic, USA).

7) Análisis Estadístico.

Los datos fueron analizados mediante el programa GraphPad Prism ® versión 5.01, usando *t* de Student de una cola para peso corporal, ingesta de alimento y parámetros reproductivos. Los resultados fueron expresados como el promedio ± el error estándar promedio (SEM). Se estableció * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ para indicar diferencias estadísticamente significativas.

Resultados.

Caracterización del modelo de obesidad gestacional: Peso y función reproductiva de las madres.

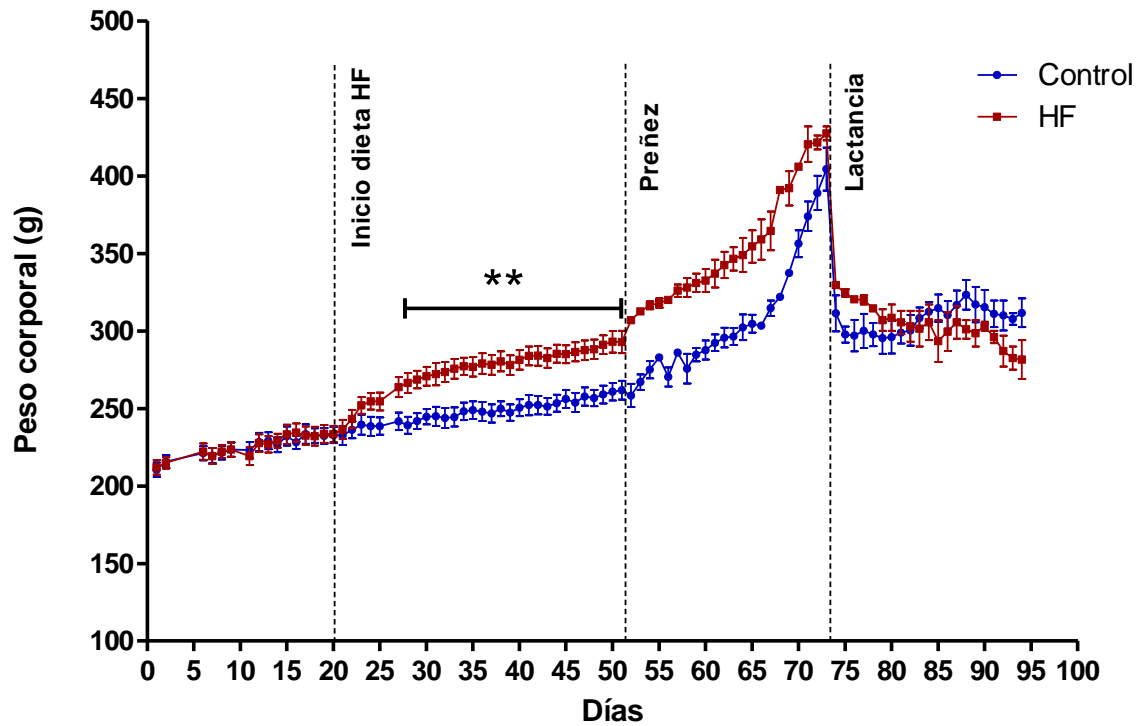


Figura 4. Curva de peso corporal (g) de las ratas madres durante los periodos pre-gestacional (n=6 para cada grupo), preñez (n=3 para grupo control; n=2 para grupo HF), y lactancia (n=3 para grupo control; n=2 para grupo HF). Los resultados se expresan en el promedio \pm SEM. ** p<0.01 vs control.

Durante el periodo en que ambos grupos de madres fueron alimentadas con una dieta estándar los pesos entre grupos fueron similares (Fig. 4) Luego de dar inicio a la dieta alta en grasa (día 20), el grupo de madres alimentadas con la dieta HF comenzó a ganar más peso que el grupo de madres control, siendo significativa esta diferencia desde el día 27 en adelante (p<0.01).

En la preñez por diversas circunstancias (explicadas en metodología) solo se siguen 3 ratas control y 2 ratas HF. Las madres HF tienden a un mayor peso que las madres control lo que se mantiene hasta la segunda semana de la preñez aproximadamente, y durante la última semana de preñez las madres del grupo control tienden a ganar más peso que el grupo de madres alimentadas con una dieta alta en grasa.

En el periodo de lactancia, a pesar de que el grupo de madres alimentadas con una dieta alta en grasa tienden a tener un mayor peso que el grupo de madres control durante los primeros días, esta diferencia comenzó a disminuir hasta que, desde el día 10 hasta el final de la lactancia, el peso de las madres HF quedo por debajo del grupo de madres control.

Tabla 2. Ciclicidad estral y características reproductivas de las madres.

	Control	HF
% de ovulación 1° mes de dieta	84.52 ± 5.273	76.57 ± 8.226
% de ovulación 2° mes de dieta	60.00 ± 20.00	55.00 ± 8.414
N° de ciclos estrales completos 1° mes	5.167 ± 0.4773	4.833 ± 0.7032
N° de ciclos estrales completos 2° mes	3.0 ± 1.000	2.800 ± 0.4899 ^a
Intentos de cruce sin resultado de preñez	0.5000 ± 0.2887	2.800 ± 0.7348 *

Porcentaje de ovulación, el número de ciclos estrales de las ratas madres control (n=6) y HF (n=6) para el primer y segundo mes de dieta y los intentos de cruce sin resultado de preñez. Los resultados se muestran en el promedio ± SEM. * p<0.05 vs control; ^ap<0.05 vs 1° mes de dieta.

No existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos al medir porcentaje de ovulación y número de ciclos estrales completos (Tabla 2), sin embargo al comparar la cantidad de ciclos estrales del grupo HF al primer mes de dieta contra el segundo mes de ésta existe un menor número de ciclos completos posterior a los 30 días de tratamiento con dieta alta en grasa (4.833 ± 0.7032 v/s 2.800 ± 0.4899; p<0.05). Por otro

lado, existe un aumento en los intentos de cruce sin resultado de preñez comparado entre grupos (Grupo control n=4: 0.5000 ± 0.2887 ; Grupo HF n=5: 2.800 ± 0.7348 ; $p < 0.05$), en donde las madres HF tuvieron una mayor cantidad de cruces para lograr la preñez efectiva.

Evaluación de parámetros metabólicos en ratas descendientes de madres obesas comparadas con controles.

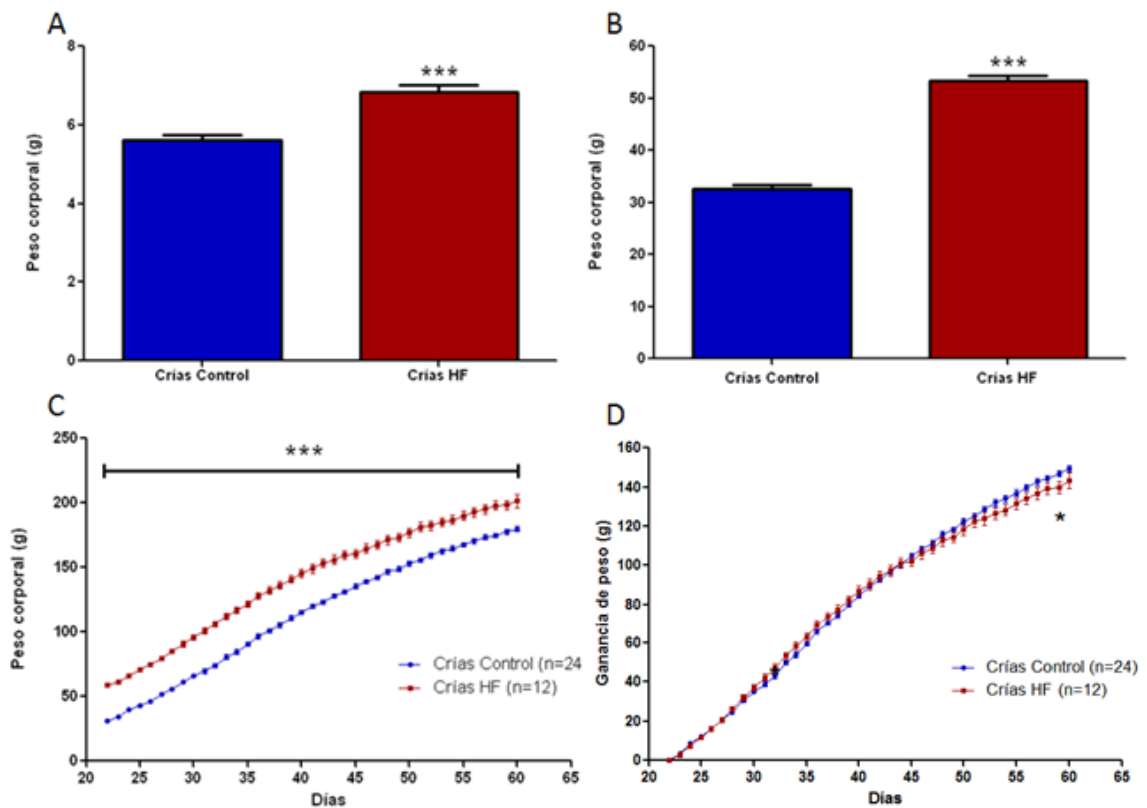


Figura 5. Peso corporal de la descendencia desde el nacimiento hasta el día post natal 60. (A) Peso corporal de la descendencia (machos y hembras) al nacer. (B) Peso corporal de la descendencia (machos y hembras) al destete. (C) Curva de peso corporal de las crías hembras desde el destete hasta el día post natal 60. (D) Ganancia de peso (g) de las crías hembras desde el destete hasta el día post natal 60. Los resultados se expresan en el promedio \pm SEM. * $p < 0.05$ vs control; *** $p < 0.001$ vs control.

Las crías de madres alimentadas con una dieta alta en grasa pesaron significativamente más que las crías de madres control (Fig. 5A, crías HF: 6.833 ± 0.1871 ; crías control $5.625 \pm$

0.1319, $p < 0.001$), y esta diferencia se mantuvo durante todo el período de lactancia. Es importante considerar que al nacer, las crías HF pesaban un 21% más que las crías control, y para el final de la lactancia, esta diferencia aumentó a un 64% (Fig. 5B, crías 53.42 ± 0.9304 ; crías control: 32.56 ± 0.8562 , $p < 0.001$).

Desde el destete hasta el día post natal 60, las crías de madres alimentadas con una dieta alta en grasa continuaron pesando más que las crías del grupo control (Fig. 5C, $p < 0.001$), sin embargo la ganancia de peso que tuvieron durante este periodo (Fig. 5D) fue similar al de las crías de madres control, e incluso desde el día 45 las crías HF tienden a ganar menos peso que las crías control.

Tabla 3. Características macroscópicas de las crías hembras al día post natal 60.

	Crías control	Crías HF
Peso promedio de Ovarios (mg)	36.57 ± 1.076	39.59 ± 1.022
Útero (mg)	325.5 ± 7.286	$372.7 \pm 31.39^*$
Hígado (g)	6.296 ± 0.1192	$7.347 \pm 0.2417^{***}$
Músculo Tibial (mg)	312.9 ± 9.122	$382.8 \pm 22.34^{**}$

Los resultados se expresan en el promedio \pm SEM. Crías HF $n=12$; crías control $n=24$. * $p < 0.05$ vs Control; ** $p < 0.01$ vs control; *** $p < 0.001$ vs control.

Los pesos del útero, hígado, y músculo tibial fueron mayores en el grupo de crías HF en comparación a las crías control (Tabla 3, $p < 0.05$; $p < 0.001$; $p < 0.01$ respectivamente). Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en el peso del promedio de los ovarios.

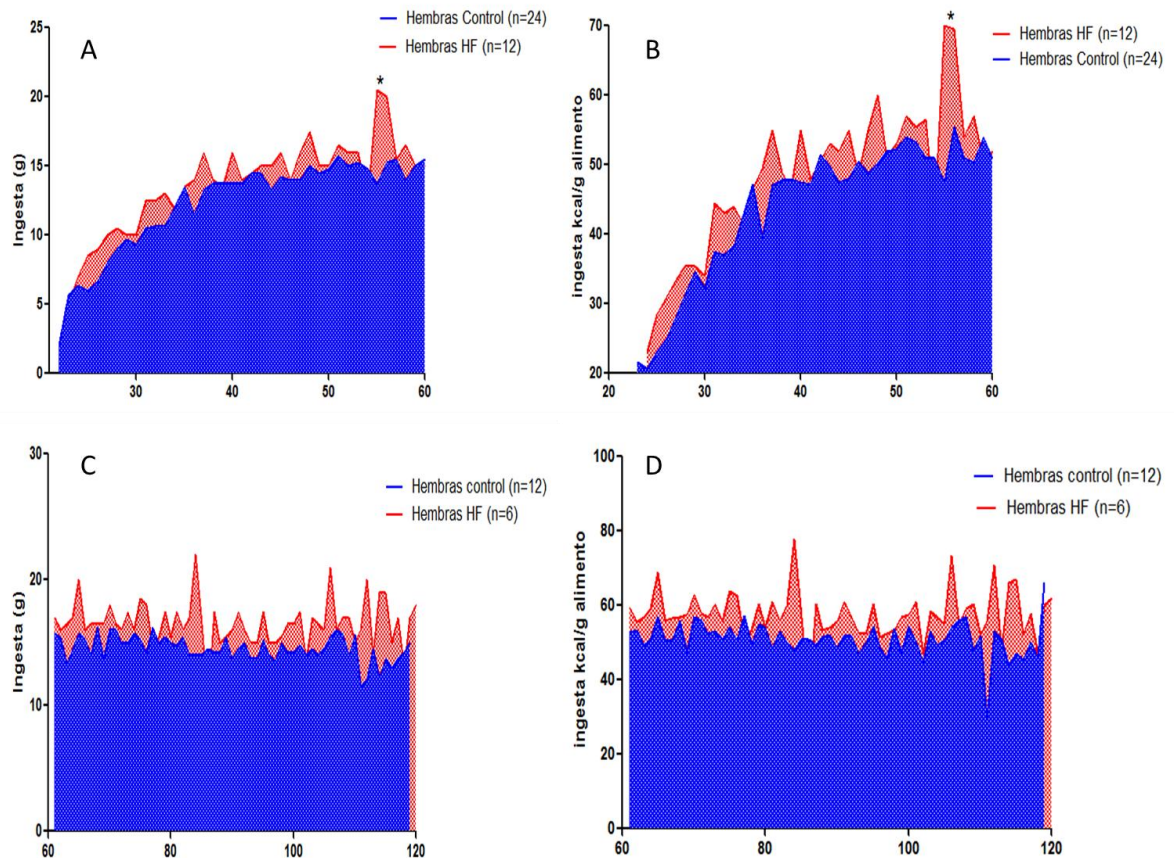


Figura 6. Ingesta de las crías desde el destete hasta el día post natal 120. (A) ingesta promedio de alimento (g) desde el destete hasta el día 60 en hembras. (B) Ingesta calórica (kcal/g) desde el destete hasta el día 60 en hembras. (C) Ingesta promedio de alimento (g) desde el día 60 hasta el día 120. (D) Ingesta calórica (kcal/g) desde el día 60 hasta el día 120. Los resultados se muestran como el promedio de la ingesta diaria. * $p < 0.05$ vs Control.

Tanto la ingesta promedio de alimento en gramos como en calorías muestra una tendencia al aumento en hembras hijas de madres alimentadas con dieta alta en grasa desde el destete hasta el día posnatal 60, mostrando una diferencia significativa solamente para los días 55 y 56 (Fig. 6A y 6B, $p < 0.05$). Desde el día 61 posnatal hasta el día 120 la ingesta promedio de alimento, a pesar de no presentar diferencias significativas, muestra una tendencia a un mayor consumo de alimento (Fig. 6C y 6D).

Evaluación de parámetros reproductivos en ratas descendientes de madres obesas comparadas con controles.

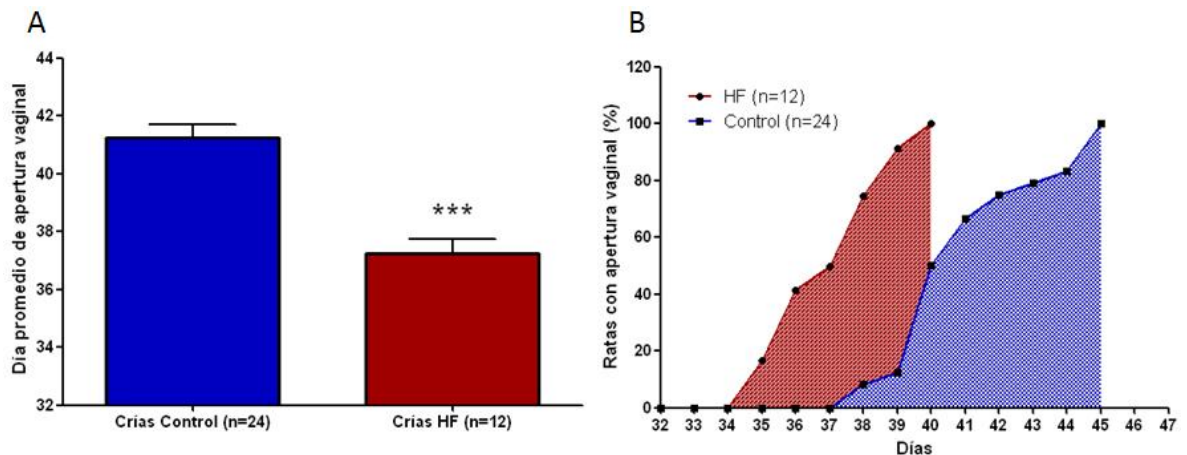


Figura 7. Llegada a la pubertad de las crías hembras de ambos grupos. (A) Día promedio de apertura vaginal. (B) Porcentaje de ratas con apertura vaginal. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM. *** $p < 0.001$ vs control.

El día promedio de apertura vaginal fue menor en las crías HF que en las crías control (Fig. A, crías HF: 37.25 ± 0.4787 ; crías control: 41.25 ± 0.4433 ; $p < 0.001$). Las crías de madres alimentadas con una dieta alta en grasa comenzaron a llegar a la pubertad en el día postnatal 35 (Fig. B) mientras que las crías de madres control lo hicieron el día 38. El 50% de las crías HF alcanzaron la pubertad en el día 37, y para el día 40 el 100% ya tenía apertura vaginal. Por otro lado, el 50% de las crías control llegó a la pubertad el día 40, y el 100% de estas crías tuvo su apertura vaginal el día post natal 45.

Tabla 4. Ciclicidad estral y porcentaje de ovulación de las crías.

	Crías control	Crías HF
% de ovulación hasta día 60	89.38 ± 3.709 (n=24)	84.75 ± 5.228 (n=12)
% de ovulación hasta día 120	83.17 ± 4.091 (n=12)	69.83 ± 6.925 (n=6)
N° de ciclos estrales completos hasta día 60	2.500 ± 0.2252 (n=24)	2.750 ± 0.3718 (n=12)
N° de ciclos estrales completos hasta día 120	14.58 ± 0.8115 (n=12)	13.67 ± 1.054 (n=6)

Porcentaje de ovulación y el número de ciclos estrales de las crías Control y HF desde el destete hasta el día 60 y hasta el día 120. Los resultados se muestran en el promedio ± SEM.

Para observar la ciclicidad estral de la descendencia se calculó tanto el porcentaje de ovulación (n° de Proestros que pasan a Estro/N° total de proestros) como la cantidad total de ciclos estrales (n° de Proestros seguidos por Estro y posteriormente Diestro). No existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (control y HF) tanto para porcentaje de ovulación como para el número de ciclos estrales completos hasta el día posnatal 60. Al extender este análisis hasta el día posnatal 120 éste muestra una similitud entre ambos grupos, existiendo solo una tendencia a la disminución del porcentaje de ovulación para las ratas tratadas con dieta HF.

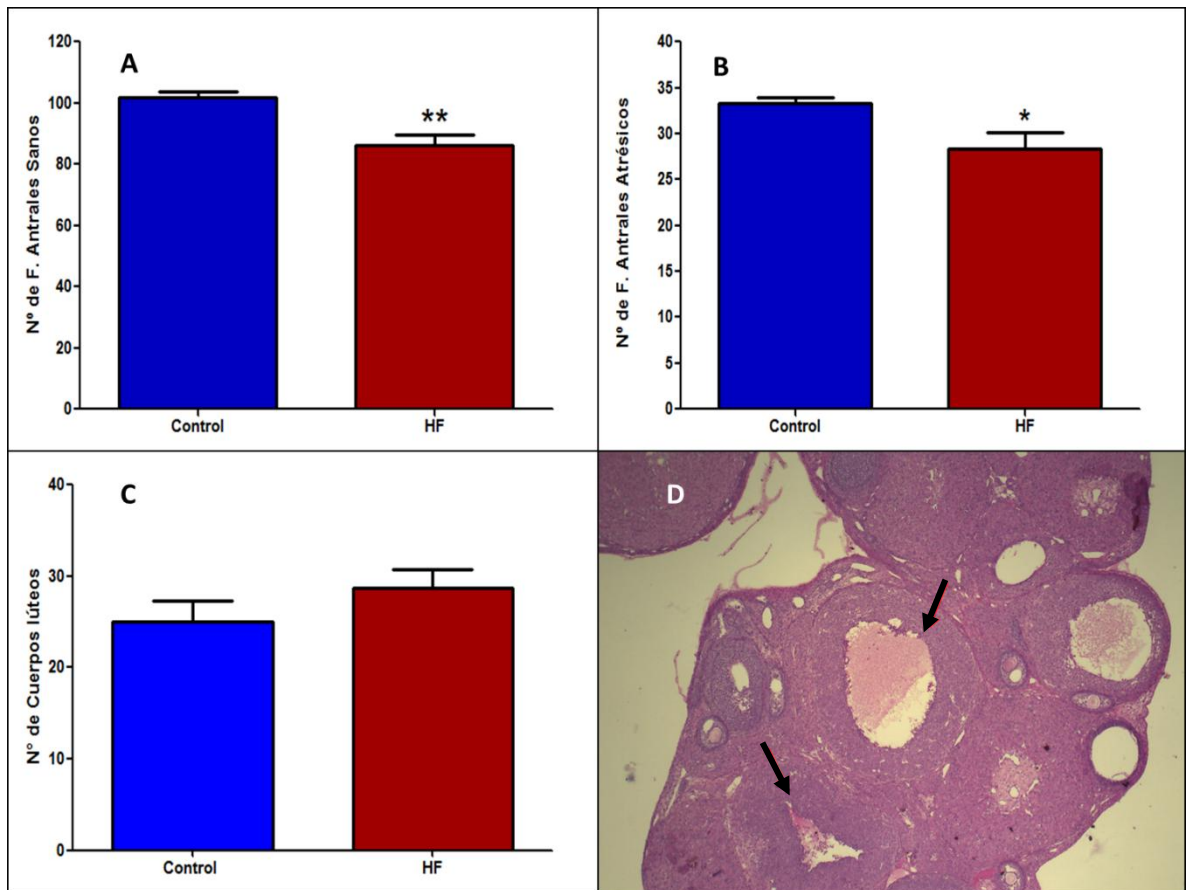


Figura 8. Morfología ovárica al día postnatal 60. (A) Folículos antrales sanos. (B) Folículos antrales atrésicos. (C) Cuerpos Lúteos. (D) Folículos luteinizados. Los resultados se expresan en el promedio \pm SEM. * $p < 0.05$ vs control. ** $p < 0.01$ vs control. Grupo control (n=3); Grupo HF (n=3).

Existe una menor cantidad de folículos antrales sanos para el grupo HF comparado con el grupo control (Fig. 8A; 101.7 ± 2.186 grupo control vs 86.33 ± 3.283 grupo HF), siendo esta diferencia significativa. Por otro lado, encontramos una diferencia estadísticamente significativa en la cantidad de folículos atrésicos, los cuales se presentan en cantidades menores (Fig. 8B; 33.33 ± 0.6667 grupo control; 28.33 ± 1.856 grupo HF). En cuanto al número de cuerpos lúteos no existen diferencias significativas entre ambos grupos (Fig. 8C; 25.00 ± 2.309 grupo control vs 28.67 ± 2.028 grupo HF). Adicional a lo anterior, solo en el grupo de ratas tratadas se identificó la presencia de Folículos anómalos, los cuales

aparentemente no ovularon pero y tienen la apariencia de quistes luteinizados. La figura 8D corresponde a una microfotografía donde se señalan estos folículos anómalos con una flecha de color negro.

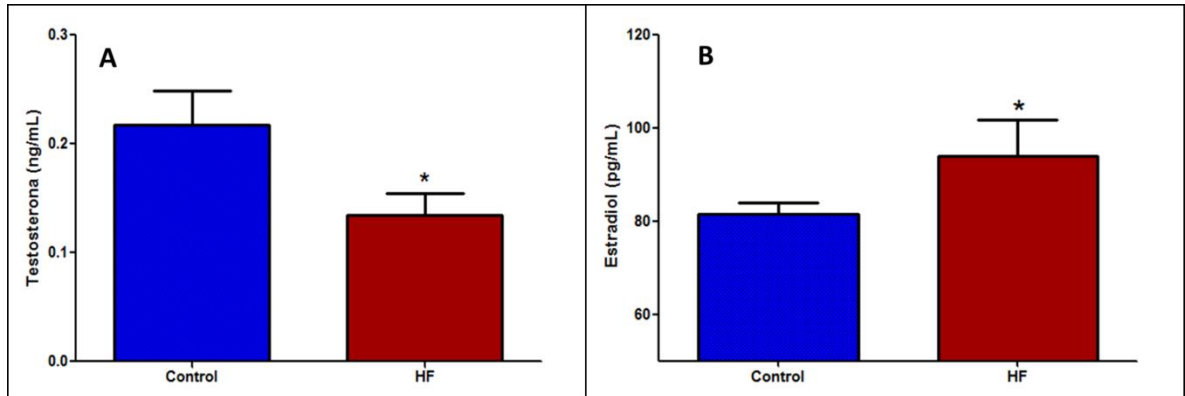


Figura 9. Niveles séricos de hormonas sexuales al día postnatal 60. (A) Testosterona sérica (ng/mL). (B) Estradiol sérico (pg/mL). Los resultados se expresan en el promedio \pm SEM. * $p < 0.05$ vs Control.

Se determinaron niveles Testosterona sérica (Fig. 9A) y se encontró una disminución de esta hormona para el grupo HF ($p < 0.05$; 0.2177 ± 0.03082 $n=8$ grupo control vs 0.1348 ± 0.02009 $n=6$ grupo HF). En el caso de la hormona Estradiol (Fig. 9B), existe un aumento de la concentración sérica para el grupo HF en comparación con el control ($p < 0.05$; 81.59 ± 2.397 $n=7$ grupo control vs 93.97 ± 7.854 $n=4$ grupo HF).

Discusión.

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que la obesidad inducida por la dieta alta en grasa durante la gestación y lactancia programa alteraciones en la función reproductiva de la descendencia, las cuales se ven reflejadas principalmente en el adelanto de la pubertad, y en la disminución en el número de folículos antrales que evidenciaron las crías HF en comparación a las crías control.

Extensa es la evidencia que existe sobre la obesidad y el impacto que genera sobre el organismo. Por medio de la siguiente investigación pudimos demostrar que este impacto no solo afecta a la madre sino que además programa alteraciones metabólicas y reproductivas a su descendencia, independiente del tipo de alimentación que ésta última posea.

Efecto de la administración de la dieta alta en grasa en las madres, previo y durante la gestación y durante el periodo de lactancia.

El modelo de obesidad materna previo, durante la gestación y la lactancia utilizado en este estudio logró replicar las alteraciones metabólicas que están descritas en la evidencia[26, 35, 36]. Las madres alimentadas con una dieta alta en grasa presentaron: 1) disminución en el número de ciclos estrales al segundo mes de iniciada la dieta en comparación al primer mes, 2) dificultad para tener una preñez exitosa, y 3) problemas obstétricos al momento del parto. Todas estas complicaciones han sido descritas anteriormente en humanos [5]. Adicional a la evidencia en humanos, existe un estudio que muestra que la implantación del ovocito en el endometrio puede verse afectada por la obesidad causado por un aumento de adipocitos en el útero, que traería como consecuencia un aumento de citoquinas proinflamatorias en la pared uterina[37]. Por lo tanto, esto nos lleva a creer que nuestras

ratas que no tuvieron una preñez exitosa presentaron dificultades para una preñez efectiva generadas por los desórdenes metabólicos producidos por la obesidad.

Además de los problemas reproductivos mencionados anteriormente, nuestras ratas madres obesas presentaron una menor ganancia de peso a la tercera semana de gestación lo que reproduce diversos estudios llevados a cabo en humanos [38-40]. Posterior al parto, se produjo una baja de peso de las madres incluso llegando a ser inferior que las ratas control desde el día 10 de lactancia. En un estudio se relaciona la cantidad de energía entregada en la leche materna de ratas con dieta HF y se demuestra que ésta leche es más rica en grasa, sumado a esto se evidencia que éstas ratas pasan más tiempo con sus crías amamantándolas y menos tiempo descansando[41], esto podría explicar la baja de peso de las ratas HF ya que, al pasar más tiempo alimentando a sus crías, se genera una demanda metabólica importante lo que se traduce en un balance energético negativo y una posterior baja de peso.

Evaluación de parámetros metabólicos en ratas descendientes de madres obesas comparadas con controles.

Las hijas de madres obesas presentaron un peso al nacer superior al grupo control. Strakovsky[16], y Ashino[17] previamente habían demostrado que la obesidad materna inducida por la dieta provocaba que las crías al momento de nacer fueran más pesadas. Además evaluaron el porcentaje de grasa al momento de nacer el cual mostró un incremento en la cantidad de grasa de estas ratas hijas de madres obesas. Creemos que el ambiente de exceso energético y graso que entregaba la madre a los fetos, generó un

balance positivo de energía que se tradujo en que estas crías pesaran más que el grupo control al nacimiento.

Esta diferencia de peso entre grupos siguió a lo largo de la lactancia, tiempo en que la madre aún estaba alimentándose con una dieta HF. Evidencia señalada anteriormente muestra que madres alimentadas con una dieta alta en grasa presentan un mayor tiempo cuidando y amamantando a sus crías durante el periodo de oscuridad y por consiguiente presentan menos tiempo descansando[41]. Por otro lado en este mismo estudio se evaluó el contenido graso de la leche materna del grupo de madres HF y se comparó con un grupo control demostrando que existe una elevación del contenido graso durante los días postnatales 10 al 21 en promedio. Adicional a esto, el contenido de agua es significativamente menor y el contenido proteico es mayor. Además se evaluó la ingesta en el periodo de lactancia, mostrando que estas ratas hijas de madres obesas presentaban una ingesta superior [41]. Otro estudio muestra una tendencia de las madres obesas a estar más tiempo en contacto con sus crías [26]. Por consiguiente, creemos que si en nuestra serie experimental se reproduce esta evidencia, las crías HF pueden haber presentado hiperfagia y haber estado más tiempo amamantando lo que lleva a un aporte energético superior que finalmente se ve reflejado en el aumento significativo de peso de las crías HF.

Al momento del destete, ambos grupos de crías comenzaron a alimentarse con una dieta estándar. A pesar de este hecho nuestras crías HF presentaron una tendencia a una mayor ingesta alimentaria que se mantuvo durante todo el desarrollo experimental. Un estudio similar al nuestro muestra que existe hiperfagia en crías hijas de madres alimentadas con una dieta alta en grasa[15]. Este incremento en la ingesta se asocia a un aumento en los

niveles séricos de leptina que presentó el grupo de crías HF hasta el destete lo que presumiblemente produjo una resistencia a esta hormona resultando en una inhibición de los mecanismos reguladores del apetito[15]. Sumado a esto en un estudio se calcula la ingesta de ratas lactantes la cual muestra que existe un aumento de la ingesta en ratas hijas de madres alimentadas con dieta alta en grasa [41]. A pesar de que en nuestro estudio no medimos los niveles de leptina sérica, lo descrito anteriormente en relación a esta hormona puede explicar la tendencia al aumento en la ingesta de alimentos que mostró el grupo de crías HF.

Al finalizar nuestra serie experimental (día postnatal 60) las diferencias en el peso entre grupos siguieron siendo significativas. Sumado a lo anterior, de los órganos pesados al momento de la eutanasia, hígado, útero y músculo tibial tenían un peso mayor. Evidencia recopilada de estudios realizados con un protocolo similar al nuestro, demuestran que el peso del hígado es mayor [42], y que el contenido de triglicéridos hepático era significativamente mayor en ratas hijas de madres obesas [17, 43]. Esto implica que posiblemente nuestras ratas HF tenían un exceso de grasa que podría explicar el mayor pesaje de estos órganos. Complementario a lo anterior, en otros estudios se ha medido el contenido de grasa corporal resultando mayor en ratas hijas de madres alimentadas con dieta alta en grasa[18-20, 44], respaldando nuestra teoría de que las hijas de madres alimentadas con una dieta alta en grasa presentan un contenido graso superior al grupo control. Finalmente, aunque en nuestra tesis no presentamos como objetivo analizar a las crías machos, es interesante mencionar que el contenido de grasa epididimal de machos

hijos de madres HF era mayor que en los controles (Datos no mostrados) indicando una mayor adiposidad en hijos adultos de madres con obesidad gestacional.

Evaluación de parámetros reproductivos en ratas descendientes de madres obesas comparadas con controles.

Con respecto a las alteraciones reproductivas, nuestros resultados indican que existe un adelanto de la pubertad en hijas de madres obesas durante la gestación. Esta evidencia se ha visto también en otros estudios que utilizan el modelo de obesidad inducido por la dieta[26, 27]. Por otro lado, una menarquia precoz ha sido expuesto en algunos estudios epidemiológicos, en los cuales se asocia la obesidad materna con el adelanto de la primera menstruación en las hijas[29] . En otro estudio se demostró que el peso de nacimiento, como también la ganancia de éste a lo largo de la infancia adelantan la pubertad en niñas [45]. El hecho de que las crías HF hayan alcanzado la pubertad antes nos hace pensar que la obesidad materna puede estar induciendo la activación temprana del eje hipotálamo-hipófisis-ovario en la descendencia. Diversos estudios muestran que la exposición a estradiol o compuestos con actividad estrogénica producen un adelanto de la pubertad en ratas[34]. Por lo tanto creemos que el adelanto en la pubertad se puede deber a que la obesidad gestacional y durante la lactancia programa un incremento en los niveles de estradiol durante el desarrollo de las crías induciendo una pubertad temprana. Es interesante que la obesidad gestacional también incrementa la susceptibilidad de generar tumores mamarios en roedores de forma similar a la administración de un compuesto estrogénico[46]. Más estudios son necesarios para confirmar la hipótesis de un incremento de estradiol en edades tempranas producto de la obesidad gestacional.

En la actualidad no existe evidencia en la literatura que relacione la obesidad materna con alteraciones del desarrollo folicular ovárico en la descendencia, lo que da a nuestros resultados obtenidos una gran importancia en esta área de investigación. La disminución de los folículos antrales sanos y atrésicos observada en nuestra serie experimental es parecida a la obtenida en un modelo de administración temprana de estradiol [34] pero de una magnitud mayor que la obtenida en este modelo experimental. Esto podría implicar que existen niveles altos de estradiol durante el desarrollo de las ratas hijas, lo que queda por demostrarse en un futuro. Otro efecto de la administración temprana de estradiol es el desarrollo de quistes ováricos, y aunque nosotros no observamos al microscopio los quistes ováricos, evidenciamos la presencia de estructuras anómalas sin ovocitos que podrían ser similares a los quistes ováricos. Para observar si realmente se producen quistes ováricos en nuestro modelo sería interesante observar la morfología ovárica en un plazo más extenso de la vida posnatal.

El incremento en el estradiol sérico observado hijas de madres obesas puede tener diversos orígenes; como por ejemplo un incremento en la síntesis ovárica o extra ovárica o una disminución en su metabolización hepática. En este contexto, se ha visto que la obesidad está asociada con un aumento en la expresión de la enzima aromatasa, la cual media la transformación de testosterona a estradiol. De acuerdo a lo anterior, un aumento de la actividad de la aromatasa en nuestras crías HF produciría el incremento de estradiol observado, llevando a una mayor utilización de su sustrato, que corresponde a Testosterona. Coherentemente, encontramos que los niveles de Testosterona estaban disminuidos. Por otro lado, existen diversas enzimas hepáticas que metabolizan estradiol, entre ellas el

Citocromo P450 3a (CYP3a). Recientemente se demostró que una alimentación alta en grasa durante la gestación disminuye la expresión y la actividad del CYP3a[47] en la descendencia, lo que podría contribuir a los niveles aumentados de estradiol en nuestras crías HF.

Por lo tanto, la evidencia expuesta anteriormente nos lleva a pensar que la obesidad programa una pubertad precoz y alteraciones en la función reproductiva de la descendencia que podrían atribuirse a un aumento del estradiol sérico durante el desarrollo del individuo.

Finalmente, creemos que son necesarios más estudios que determinen los niveles de estradiol en etapas previas a la pubertad, así como un recuento de folículos primordiales, primarios y secundarios para poder identificar las reales implicancias reproductivas de la alteración en el número de folículos antrales. Además, sería interesante que se analice la morfología ovárica en edades más avanzadas del desarrollo, para determinar si las estructuras similares a quistes que encontramos en nuestras crías de madres obesas llegan a formar quistes ováricos.

Conclusiones.

- 1) Las hijas de madres alimentadas con dieta alta en grasa presentan un adelanto de la pubertad que puede estar mediado por un exceso de estradiol generado por la obesidad materna durante la gestación. No existieron cambios en los ciclos estrales por lo que creemos es necesario hacer un seguimiento experimental más extenso a esta descendencia.
- 2) La obesidad materna durante la gestación y lactancia genera un aumento en el peso y la ingesta de alimentos en la descendencia independiente de la alimentación que tenga ésta a lo largo de su vida.
- 3) Existen cambios en la foliculogénesis de las hijas de madres alimentadas con una dieta alta en grasa, mostrando una baja en el desarrollo folicular y un desarrollo de estructuras similares a los quistes ováricos presentados en las crías tratadas.
- 4) Ratas hijas de madres con obesidad gestacional presentaron una disminución en la testosterona sérica y un incremento en el estradiol sérico, lo que podría deberse a un incremento en la actividad aromatasa.

Referencias.

1. Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ, et al. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet*. Feb 12;377(9765):557-67.
2. Flegal KM, Carroll MD, Kuczmarski RJ, Johnson CL. Overweight and obesity in the United States: prevalence and trends, 1960-1994. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1998 Jan;22(1):39-47.
3. Encuesta Nacional de Salud, Chile. In: MINSAL, editor.; 2009-2010. p. 29.
4. OMS. Obesidad y Sobrepeso. 2013 [cited 2013 19-04-2013]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>
5. Metwally M, Li TC, Ledger WL. The impact of obesity on female reproductive function. *Obes Rev*. 2007 Nov;8(6):515-23.
6. Atalah E. Epidemiology of obesity in Chile. *Rev Med Clin Condes*. 2012:117-23.
7. Atalah E, Castro R. [Maternal obesity and reproductive risk]. *Rev Med Chil*. 2004 Aug;132(8):923-30.
8. Lucas A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp*. 1991;156:38-50; discussion -5.
9. Ozanne SE, Lewis R, Jennings BJ, Hales CN. Early programming of weight gain in mice prevents the induction of obesity by a highly palatable diet. *Clin Sci (Lond)*. 2004 Feb;106(2):141-5.

10. Vickers MH, Breier BH, Cutfield WS, Hofman PL, Gluckman PD. Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000 Jul;279(1):E83-7.
11. Ozanne SE, Hales CN. Lifespan: catch-up growth and obesity in male mice. *Nature.* 2004 Jan 29;427(6973):411-2.
12. Morris M. Early life influences on obesity risk: maternal overnutrition and programming of obesity. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 2009;4:625-37.
13. Li M. Maternal obesity and developmental programming of metabolic disorders in offspring: evidence from animal models. *Exp Diabetes Res.* 2011;2011:592408.
14. Khan IY, Dekou V, Douglas G, Jensen R, Hanson MA, Poston L, et al. A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005 Jan;288(1):R127-33.
15. Kirk SL, Samuelsson AM, Argenton M, Dhonye H, Kalamatianos T, Poston L, et al. Maternal obesity induced by diet in rats permanently influences central processes regulating food intake in offspring. *PLoS One.* 2009;4(6):e5870.
16. Strakovsky RS, Zhang X, Zhou D, Pan YX. Gestational high fat diet programs hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and histone modification in neonatal offspring rats. *J Physiol.* 2011 Jun 1;589(Pt 11):2707-17.
17. Ashino NG, Saito KN, Souza FD, Nakutz FS, Roman EA, Velloso LA, et al. Maternal high-fat feeding through pregnancy and lactation predisposes mouse offspring to molecular insulin resistance and fatty liver. *J Nutr Biochem.* 2011 Apr;23(4):341-8.

18. Tamashiro KL, Terrillion CE, Hyun J, Koenig JI, Moran TH. Prenatal stress or high-fat diet increases susceptibility to diet-induced obesity in rat offspring. *Diabetes*. 2009 May;58(5):1116-25.
19. Bayol SA, Simbi BH, Bertrand JA, Stickland NC. Offspring from mothers fed a 'junk food' diet in pregnancy and lactation exhibit exacerbated adiposity that is more pronounced in females. *J Physiol*. 2008 Jul 1;586(13):3219-30.
20. Chen H, Simar D, Lambert K, Mercier J, Morris MJ. Maternal and postnatal overnutrition differentially impact appetite regulators and fuel metabolism. *Endocrinology*. 2008 Nov;149(11):5348-56.
21. Taylor PD, McConnell J, Khan IY, Holemans K, Lawrence KM, Asare-Anane H, et al. Impaired glucose homeostasis and mitochondrial abnormalities in offspring of rats fed a fat-rich diet in pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005 Jan;288(1):R134-9.
22. Ghosh P, Bitsanis D, Ghebremeskel K, Crawford MA, Poston L. Abnormal aortic fatty acid composition and small artery function in offspring of rats fed a high fat diet in pregnancy. *J Physiol*. 2001 Jun 15;533(Pt 3):815-22.
23. Levy BY. *Fisiología, Sección VIII: Sistema Endocrino y Aparato Reprodutor, Los aparatos reproductores femenino y masculino*, Sexta ed; 2009.
24. Neill J. *Physiology of Reproduction*. 43. Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat. Third ed. 2006
25. Hilakivi-Clarke L, Clarke R, Onojafe I, Raygada M, Cho E, Lippman M. A maternal diet high in n - 6 polyunsaturated fats alters mammary gland development,

- puberty onset, and breast cancer risk among female rat offspring. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Aug 19;94(17):9372-7.
26. Connor KL, Vickers MH, Beltrand J, Meaney MJ, Sloboda DM. Nature, nurture or nutrition? Impact of maternal nutrition on maternal care, offspring development and reproductive function. *J Physiol*. 2012 May 1;590(Pt 9):2167-80.
 27. Sloboda DM, Howie GJ, Pleasants A, Gluckman PD, Vickers MH. Pre- and postnatal nutritional histories influence reproductive maturation and ovarian function in the rat. *PLoS One*. 2009;4(8):e6744.
 28. Brill DS, Moenter SM. Androgen receptor antagonism and an insulin sensitizer block the advancement of vaginal opening by high-fat diet in mice. *Biol Reprod*. 2009 Dec;81(6):1093-8.
 29. Keim SA, Branum AM, Klebanoff MA, Zemel BS. Maternal body mass index and daughters' age at menarche. *Epidemiology*. 2009 Sep;20(5):677-81.
 30. Balasubramanian P, Jagannathan L, Mahaley RE, Subramanian M, Gilbreath ET, Mohankumar PS, et al. High fat diet affects reproductive functions in female diet-induced obese and dietary resistant rats. *J Neuroendocrinol*. 2011 May;24(5):748-55.
 31. Lewis EM, Barnett JF, Jr., Freshwater L, Hoberman AM, Christian MS. Sexual maturation data for Crl Sprague-Dawley rats: criteria and confounding factors. *Drug Chem Toxicol*. 2002 Nov;25(4):437-58.
 32. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol*. 2002 Nov;62(4A):609-14.

33. Lara HE, Dissen GA, Leyton V, Paredes A, Fuenzalida H, Fiedler JL, et al. An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal component of steroid-induced polycystic ovary in the rat. *Endocrinology*. 2000 Mar;141(3):1059-72.
34. Cruz G, Barra R, Gonzalez D, Sotomayor-Zarate R, Lara HE. Temporal window in which exposure to estradiol permanently modifies ovarian function causing polycystic ovary morphology in rats. *Fertil Steril*. 2012 Nov;98(5):1283-90.
35. Ferezou-Viala J, Roy AF, Serougne C, Gripois D, Parquet M, Bailleux V, et al. Long-term consequences of maternal high-fat feeding on hypothalamic leptin sensitivity and diet-induced obesity in the offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007 Sep;293(3):R1056-62.
36. Howie GJ, Sloboda DM, Kamal T, Vickers MH. Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. *J Physiol*. 2009 Feb 15;587(Pt 4):905-15.
37. Shankar K, Zhong Y, Kang P, Lau F, Blackburn ML, Chen JR, et al. Maternal obesity promotes a proinflammatory signature in rat uterus and blastocyst. *Endocrinology*. 2011 Nov;152(11):4158-70.
38. Castellano Filho DS, do Amaral Correa JO, Dos Santos Ramos P, de Oliveira Montessi M, Aarestrup BJ, Aarestrup FM. Body weight gain and serum leptin levels of non-overweight and overweight/obese pregnant women. *Med Sci Monit*. 19:1043-9.

39. Sato AP, Fujimori E. Nutritional status and weight gain in pregnant women. *Rev Lat Am Enfermagem*. 2012 May-Jun;20(3):462-8.
40. Morken NH, Klungsoyr K, Magnus P, Skjaerven R. Pre-pregnant body mass index, gestational weight gain and the risk of operative delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2013 Jul;92(7):809-15.
41. Purcell RH, Sun B, Pass LL, Power ML, Moran TH, Tamashiro KL. Maternal stress and high-fat diet effect on maternal behavior, milk composition, and pup ingestive behavior. *Physiol Behav*. 2011 Sep 1;104(3):474-9.
42. Shankar K, Kang P, Harrell A, Zhong Y, Marecki JC, Ronis MJ, et al. Maternal overweight programs insulin and adiponectin signaling in the offspring. *Endocrinology*. 2010 Jun;151(6):2577-89.
43. Krasnow SM, Nguyen ML, Marks DL. Increased maternal fat consumption during pregnancy alters body composition in neonatal mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011 Dec;301(6):E1243-53.
44. Shankar K, Harrell A, Liu X, Gilchrist JM, Ronis MJ, Badger TM. Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008 Feb;294(2):R528-38.
45. Sloboda DM, Hart R, Doherty DA, Pennell CE, Hickey M. Age at menarche: Influences of prenatal and postnatal growth. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Jan;92(1):46-50.

46. de Assis S, Warri A, Cruz MI, Laja O, Tian Y, Zhang B, et al. High-fat or ethinyl-oestradiol intake during pregnancy increases mammary cancer risk in several generations of offspring. *Nat Commun.* 2012;3:1053.
47. Tajima M, Ikarashi N, Okaniwa T, Imahori Y, Saruta K, Toda T, et al. Consumption of a high-fat diet during pregnancy changes the expression of cytochrome P450 in the livers of infant male mice. *Biol Pharm Bull.* 2012;36(4):649-57.

Anexos.

Anexo 1. Cumplimiento del cronograma de actividades de la Tesis de Grado.

	Mes	Mayo				Junio				Julio				Agosto			
	Semana	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Desarrollo Serie Experimental																	
Inicio dieta alta en grasa					v												
Preñez									v								
Lactancia													v				
Crías 60 días																	v
Crías 120 días																	
Desarrollo metodológico																	
Pesaje animales y alimento																	
CiclicidadEstral																	
Morfología ovárica																	
Análisis hormonal																	
Análisis de Resultados																	
Desarrollo de Tesis (Escrito)																	
Entrega de Tesis																	

	Mes	Septiembre				Octubre				Noviembre				Diciembre			
	Semana	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Desarrollo Serie Experimental					v												
Inicio dieta alta en grasa																	
Preñez																	
Lactancia																	
Crías 60 días																	
Crías 120 días									v								
Desarrollo metodológico									v								
Pesaje animales y alimento									v								
CiclicidadEstral									v								
Morfología ovárica														v			
Análisis hormonal														v			
Análisis de Resultados														v			
Desarrollo de Tesis (Escrito)														v			
Entrega de Tesis															v		

