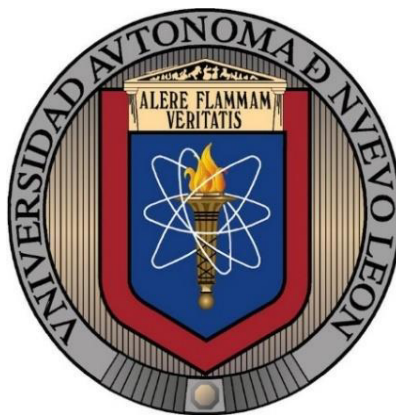


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN



**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN MATERNA CON FLAVONOIDES
SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE GCK HEPÁTICA EN LA
DESCENDENCIA ADULTA**

POR

L.N.B CAROLINA TREVIÑO DE ALBA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

SEPTIEMBRE, 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN



TESIS

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN MATERNA CON FLAVONOIDES
SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE GCK HEPÁTICA EN LA
DESCENDENCIA ADULTA**

PRESENTA

L.N.B CAROLINA TREVIÑO DE ALBA

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

MONTERREY, NUEVO LEÓN, MÉXICO

SEPTIEMBRE DE 2018

Dra. en C. Blanca Edelia González Martínez
Subdirectora de Investigación, Innovación y Posgrado
Facultad de Salud Pública y Nutrición
Universidad Autónoma de Nuevo León

P R E S E N T E

Por este conducto le comunicamos que hemos concluido la dirección y codirección de la tesis titulada **“EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN MATERNA CON FLAVONOIDES SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE GCK HEPÁTICA EN LA DESCENDENCIA ADULTA”**, presentada por la L.N.B Carolina Treviño de Alba con la finalidad de obtener el grado de Maestría en Ciencias en Nutrición.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

Atentamente

“Alere Flammam Veritatis”

Monterrey, Nuevo León a 21 de septiembre de 2018.

Dra. Ana Laura I. de la Garza Hernández

Directora

Dr. Alberto Camacho Morales

Co-Director

COMITÉ DE EVALUACIÓN DE TESIS

El comité de evaluación de tesis **APROBÓ** la tesis titulada “**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN MATERNA CON FLAVONOIDES SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE GCK HEPÁTICA EN LA DESCENDENCIA ADULTA**”, presentada por la L.N.B Carolina Treviño de Alba, con la finalidad de obtener el grado de Maestría en Ciencias en Nutrición.

Dr. Heriberto Castro García

Presidente

Dra. Ana Laura Isabel de la Garza Hernández

Secretario

Dr. Alberto Camacho Morales

Vocal

Monterrey, Nuevo León, México

a 21 de septiembre de 2018

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN MATERNA CON FLAVONOIDES
SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE GCK HEPÁTICA EN LA
DESCENDENCIA ADULTA**

Aprobación de Tesis

Dra. Ana Laura Isabel de la Garza Hernández

Presidente

Dr. Heriberto Castro García

Secretario

Dr. Alberto Camacho Morales

Vocal

Dra. en C. Blanca Edelia González Martínez

Subdirectora de Investigación, Innovación y Posgrado

AGRADECIMIENTOS

“Cada logro comienza con la decisión de intentarlo” – John F. Kennedy.

En el 2015 leí esta frase en una de las muchas redes sociales y a pesar de que nos bombardean con frases inspiracionales, ésta en específico llamó mi atención cuando me encontraba interesada en estudiar la maestría. Al final de cuentas, esta frase no fue la causante primordial de mi decisión, pero me ayudo a reflexionar sobre mi futuro profesional. Las verdaderas causantes de mi decisión son todas las personas, que mencionare a continuación, que durante toda la trayectoria de la maestría (antes, durante y después) estuvieron apoyándome incondicionalmente para realizar este reto.

A Dios por la fortaleza y consuelo que me dio y me ha dado en todo momento.

A mi familia por los ánimos y el apoyo incondicional que me brindaron durante los dos años de la maestría, y prácticamente durante toda mi vida. A mi mamá y papá que su apoyo en casa fue esencial para avanzar. A mi hermana y cuñado que siempre se preocuparon y aconsejaron.

A Ana, Diana y Andrea por siempre estar al pendiente, escuchándome en mis múltiples dramas y aconsejándome para salir adelante. Gracias por siempre ayudarme a balancear lo académico con lo social.

A Germán, porque por ti mi vida se ha llenado de inspiración para ser mejor persona en todas las áreas. Gracias por ser mi apoyo estos últimos días más intensos de la maestría.

A mis compañeros de generación porque eran los únicos que podían entender 100% por lo que pasabas. Su incansable motivación para ayudarnos todos fue desde el primer semestre hasta el final, pero sobre todo agradezco la amistad que cada uno me brindó, especialmente Paola que fue el mejor equipo que pude haber tenido.

A mi directora de tesis, Dra. Ana Laura de la Garza, por su paciencia, presencia, consuelo y apoyo en todas las etapas de mi tesis. Por su constante motivación para no conformarme y pelear por lo que quiero.

Finalmente quisiera agradecerme a mi misma. Agradezco mi determinación, concentración, paciencia y persistencia en los días más difíciles, sobre todo aquellos en los que dudaba de mi capacidad, ya que fueron esenciales para la conclusión de mi tesis. Por último, quisiera aprovechar este espacio para recordarme que cualquier sueño o meta se puede alcanzar, soy suficiente y tengo lo necesario para llevar a cabo lo que me proponga en el futuro.

DEDICATORIA

*Para mi familia y todas las personas
que me apoyaron hasta el final.*

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
II. ANTECEDENTES	5
2.1 OBESIDAD	5
2.2 PROGRAMACIÓN METABÓLICA.....	10
2.3 MODELO ANIMAL.....	11
2.4 FLAVONOIDES.....	16
2.5 FLAVONOIDES Y MECANISMOS MOLECULARES	19
2.7 KAEMPFEROL (KAEMPFEROL-3-O-GLUCÓSIDO).....	27
2.8 FLAVONOIDES Y PROGRAMACIÓN METABÓLICA.....	29
III. JUSTIFICACIÓN.....	34
IV. HIPÓTESIS.....	35
V. OBJETIVOS.....	36
5.1 OBJETIVO GENERAL	36
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
VI. METODOLOGÍA.....	37
6.1 DISEÑO EXPERIMENTAL	37
6.2 DIETA EXPERIMENTAL.....	38
6.2.1 <i>Flavonoides</i>	40
6.3 PARÁMETROS BIOQUÍMICOS	40
6.3.1 <i>Niveles de glucosa en sangre</i>	40
6.3.2 <i>Niveles de leptina e insulina séricos</i>	40
6.3.3 <i>Modelo homeostático para evaluar resistencia a la insulina</i>	40
6.4 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....	41
6.4.1 <i>Aislamiento de ARN</i>	41
6.4.2 <i>Análisis cuantitativo del ARN</i>	42
6.4.3 <i>Retrotranscripción (RT)</i>	43
6.4.4 <i>Curvas de eficiencia para el análisis de PCR en tiempo real</i>	44
6.4.5 <i>RTq-PCR</i>	44
6.4.6 <i>Análisis de los resultados de la expresión génica</i>	46
VII. PLAN DE ANÁLISIS.....	47

VIII. RECURSOS	48
8.1 FINANCIEROS.....	48
8.2 HUMANOS.....	48
IX. CONSIDERACIONES ÉTICAS Y DE BIOSEGURIDAD	49
X. RESULTADOS	50
10.1 RATAS WISTAR HEMBRAS.....	50
10.2 RATAS WISTAR MACHO CRÍAS.....	51
XI. DISCUSIÓN	61
11.1 LA DIETA DE CAFETERÍA INDUCE OBESIDAD Y AUMENTA LOS NIVELES DE GLUCOSA EN SANGRE EN RATAS WISTAR MADRES.....	61
11.2 LA SUPLEMENTACIÓN MATERNA CON NARIRUTINA Y KAEMPFEROL-3-O- GLUCÓSIDO PREVIENE EL AUMENTO DE PESO EN LA EDAD ADULTA DE LA DESCENDENCIA.....	68
11.3 LA SUPLEMENTACIÓN DIETÉTICA MATERNA CON NARINGENINA-7-O-RUTINOSIDO Y KAEMPFEROL-3-O-GLUCÓSIDO DISMINUYE LA GANANCIA DE PESO DEL HÍGADO EN LA DESCENDENCIA	74
11.4 LA SUPLEMENTACIÓN DIETÉTICA MATERNA CON NARINGENINA-7-O-RUTINOSIDO Y KAEMPFEROL-3-O-GLUCÓSIDO MEJORA LA SENSIBILIDAD A LA INSULINA Y LOS NIVELES DE LEPTINA SÉRICA EN LA DESCENDENCIA.....	76
11.5 EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DIETÉTICA CON NARIRUTINA Y KAEMPFEROL- 3-O-GLUCÓSIDO DURANTE LA ETAPA PERINATAL EN RATAS WISTAR HEMBRAS, SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE GCK, FASN Y SOCS3 EN EL HÍGADO DE LA DESCENDENCIA ADULTA.	79
11.6 DISCUSIÓN GENERAL.....	87
XII. CONCLUSIONES	89
XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

LISTA DE TABLAS

TABLA 1 COMPOSICIÓN DE LAS DIETAS	14
TABLA 2 FLAVONOIDES.....	17
TABLA 3 FLAVONOIDES SOBRE LA PROGRAMACIÓN METABÓLICA	30
TABLA 4 COMPOSICIÓN: DIETA CONTROL.	39
TABLA 5 COMPOSICIÓN: DIETA DE CAFETERÍA.....	39
TABLA 6 COMPOSICIÓN: DIETA DE CAFETERÍA MÁS SUPLEMENTACIÓN.....	39
TABLA 7 PESO CORPORAL TOTAL (G) POR SEMANA DE RATAS <i>W</i> ISTAR MACHO CRÍAS ALIMENTADOS CON DIETA CONTROL.	52
TABLA 8 PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS OBTENIDOS EN RATAS <i>W</i> ISTAR MACHO CRÍAS ALIMENTADAS CON DIETA CONTROL DE HEMBRAS ALIMENTADAS CON DIETA CONTROL, OB Y OB+S EN LA ETAPA PERINATAL.	54
TABLA 9 PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN SUERO DE RATAS <i>W</i> ISTAR MACHO CRÍAS ALIMENTADAS CON DIETA CONTROL DE MADRES ALIMENTADAS CON DIETA CONTROL, OB Y OB+S EN ETAPA PERINATAL.....	55
TABLA 10 EFICIENCIAS DE AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES.	59

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. PORCENTAJE DE HOMBRES CON OBESIDAD A NIVEL MUNDIAL (WORLD OBESITY FEDERATION, 2015).....	5
FIGURA 2. PORCENTAJE DE MUJERES CON OBESIDAD A NIVEL MUNDIAL (WORLD OBESITY FEDERATION, 2015).....	6
FIGURA 3. PREVALENCIA NACIONAL DE SOBREPESO Y OBESIDAD EN POBLACIÓN ADULTA (HERNÁNDEZ ET AL., 2016).....	6
FIGURA 4. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DEL VÍNCULO ENTRE LA OBESIDAD Y LA DIABETES, ASÍ COMO SUS EFECTOS EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO, EL HÍGADO Y EL PÁNCREAS AL ESTIMULAR DIFERENTES CITOCINAS INFLAMATORIAS, ENZIMAS METABÓLICAS Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN. ADAPTADO DE KAWSER HOSSAIN ET AL., 2016.	7
FIGURA 5. ESTRUCTURA BÁSICA DEL FLAVONOIDE (VANHEES, 2012).....	16
FIGURA 6. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS FLAVONOIDES, ISOFLAVONOIDES Y NEOFLAVONOIDES, RESPECTIVAMENTE (GROTEWOLD, 2006).	17
FIGURA 7. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA NARIRUTINA (NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH, 2017).	24
FIGURA 8. ESTRUCTURA QUÍMICA DE KAEMPFEROL (U.S NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, 2017).....	27
FIGURA 9. GRÁFICA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL.	38
FIGURA 10. GANANCIA DE PESO RATAS WISTAR HEMBRAS. LOS RESULTADOS SON EXPRESADOS EN MEDIAS \pm DEM. EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO SE REALIZÓ MEDIANTE LA PRUEBA ANOVA PARA ANALIZAR LAS DIFERENCIAS DE LA MEDIA ENTRE GRUPOS Y TEST DUNNETT COMO PRUEBA POST HOC.	50
FIGURA 11. NIVELES PROMEDIO DE GLUCOSA, LOS DATOS FUERON TOMADOS EL DÍA DEL SACRIFICIO DE LAS RATAS WISTAR HEMBRAS. RESULTADOS EXPRESADOS EN MEDIAS \pm DEM. EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO SE REALIZÓ MEDIANTE LA PRUEBA ANOVA PARA ANALIZAR LAS DIFERENCIAS DE LA MEDIA ENTRE GRUPOS Y TEST DE DUNNETT COMO PRUEBA POST HOC.....	50

FIGURA 12. LOS RESULTADOS SON EXPRESADOS EN MEDIAS \pm DEM. EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO SE REALIZÓ MEDIANTE LA PRUEBA ANOVA PARA EVALUAR LAS DIFERENCIAS DE LA MEDIA ENTRE LOS GRUPOS Y TEST DE DUNNETT COMO PRUEBA POST HOC.	53
FIGURA 13. PESO DE HÍGADO DE RATAS WISTAR MACHO CRÍAS. RESULTADOS EXPRESADOS EN MEDIAS \pm DEM. EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO SE REALIZÓ MEDIANTE LA PRUEBA ANOVA PARA ANALIZAR LAS DIFERENCIAS DE LA MEDIA ENTRE GRUPOS Y TEST DE DUNNETT COMO PRUEBA POST HOC.	54
FIGURA 14. NIVELES PROMEDIO DE GLUCOSA, LOS DATOS FUERON TOMADOS EL DÍA DEL SACRIFICIO DE RATAS WISTAR MACHO CRÍAS. RESULTADOS EXPRESADOS EN MEDIAS \pm DEM. EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO SE REALIZÓ MEDIANTE LA PRUEBA ANOVA PARA ANALIZAR LAS DIFERENCIAS DE LA MEDIA ENTRE GRUPOS Y TEST DE DUNNETT COMO PRUEBA POST HOC.....	55
FIGURA 15. NIVELES PROMEDIO DE INSULINA EN RATAS WISTAR MACHO CRÍAS. RESULTADOS EXPRESADOS EN MEDIAS \pm DEM. EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO SE REALIZÓ MEDIANTE LA PRUEBA ANOVA PARA ANALIZAR LAS DIFERENCIAS DE LA MEDIA ENTRE GRUPOS Y TEST DE DUNNETT COMO PRUEBA POST HOC.	55
FIGURA 16. ÍNDICE HOMA-IR. RESULTADOS EXPRESADOS EN MEDIAS \pm DEM. EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO SE REALIZÓ MEDIANTE LA PRUEBA ANOVA PARA ANALIZAR LAS DIFERENCIAS DE LA MEDIA ENTRE GRUPOS Y TEST DE DUNNETT COMO PRUEBA POST HOC.	56
FIGURE 17. NIVELES PROMEDIO DE LEPTINA EN RATAS WISTAR MACHO CRÍAS, LOS DATOS FUERON TOMADOS EL DÍA DEL SACRIFICIO Y ALMACENADOS A -80°C PARA SU ANÁLISIS. RESULTADOS EXPRESADOS EN MEDIAS \pm DEM. EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO SE REALIZÓ MEDIANTE LA PRUEBA ANOVA PARA ANALIZAR LAS DIFERENCIAS DE LA MEDIA ENTRE GRUPOS Y TEST DE DUNNETT COMO PRUEBA POST HOC.	56
FIGURA 18. CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA LOS GENES GCK, FASN, SOCS3 Y HPRT1.....	58

FIGURA 19. EXPRESIÓN RELATIVA DE GENES GCK, FASN Y SOCS3 NORMALIZADO CON CONTROL VALOR A 1. EL NIVEL DE EXPRESIÓN RELATIVA SE CALCULÓ MEDIANTE EL MÉTODO PFAFFL. EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO SE REALIZÓ MEDIANTE PRUEBA T, RESULTADOS EXPRESADOS EN MEDIAS \pm DEM.....	60
FIGURA 20. DIAGRAMA GENERAL DEL METABOLISMO DE LOS MACRONUTRIENTES EN EL HÍGADO. ADAPTADO DE WAKIL & ABU-ELHEIGA 2009..	85
FIGURA 21. INFLUENCIA DE LA SUPLEMENTACIÓN DIETÉTICA MATERNA SOBRE LA PROGRAMACIÓN METABÓLICA DE LA DESCENDENCIA.	88

LISTA DE ABREVIATURAS

ACAT	Acetil-coenzima A aciltransferasas
ACC	Acetil-CoA carboxilasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AGL	Ácidos grasos libres
AMPK	Proteína quinasa adenosina monofosfato activada
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido rubonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Avy	Agouti amarilla viable
BP	Bajo en proteína
CAS	Caseína
COT	Carnitina O-octanoil transferasa
Ct	Ciclo umbral (Threshold cycle)
DEM	Desviación estándar media
dL	Decilitros
EGCG	Epigallocatequina galato
EPSU/GSPE	Extracto de procianidina de semilla de uva
ETV	Extracto de té verde
FAS/FASn	Sintasa de ácidos grasos
g	Gramos

GCK	Glucocquinasa
GEN	Genisteína
GLUT-4	Transportador de glucosa tipo 4
H₂O	Agua
HbA1c	Hemoglobina glucosilada
HFD	Dieta alta en grasa (High Fat Diet)
HOMA-IR	Modelo homeostático para evaluar resistencia a la insulina
HPRT1	Hipoxantina fosforibosiltransferasa 1
IL-1β	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de Masa Corporal
IRS-1	Receptor de insulina 1
ISO	Bajo en isoflavonas
JAK	Janus quinasas
JNK	Quinasa c-Jun N-terminal
Kaempferol	Kaempferol-3- <i>O</i> -glucósido
Kcal	Kilocalorías
kg	Kilogramos
LPL	Lipasa de lipoproteína plasmática
MCP-1	Proteína quimio-atrayente de monocitos
mg	Miligramos
mL	Mililitros
NAPDPH	Nicotinamida adenine dinucleótido fosfato
Narirutina	Naringenina-7- <i>O</i> -rutinósido
ng	Nanogramos

NP	Normal de proteína
OB	Dieta obesogénica
OB+S	Dieta obesogénica más suplementación
OMS	Organización Mundial de la Salud
P13K/AKT	Fosfatidilinositol-3-quinasa / Serina/Treonina quinasa
PC	Peso corporal
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PCR	Proteína C reactiva
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PKB	Proteína quinasa B
PKC	Proteína quinasa C
PPARγ	Receptor activado de proliferación de los peroxisomas gamma
RBP4	Proteína de unión de retinol 4
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con transcriptasa reversa
SOCS3	Supresor de señalización de citocinas 3
SREBP-1	Proteína ligante del elemento regulador de esteroides 1
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
μg	Microgramos
μL	Microlitros
USF	Factor estimulante corriente arriba
WHO	Organización Mundial de la Salud (World Health Organization)

RESUMEN

Introducción

Los impactos ambientales en la nutrición materna durante la embriogénesis pueden dejar una "impresión nutricional" con efectos a largo plazo en la promoción de obesidad y condiciones relacionadas en la adultez. Sin embargo, se han identificado compuestos bioactivos que pueden ejercer un efecto preventivo en el desarrollo de la obesidad.

Objetivo

Determinar el efecto de la narirutina y kaempferol-3-*O*-glucósido sobre parámetros metabólicos en la descendencia de ratas hembras alimentadas con una dieta obesogénica durante la etapa perinatal.

Material y Métodos

Las ratas madres Control fueron alimentadas con dieta estándar (335 kcal/100g); el grupo Obesogénico (OB), con dieta de "cafetería" (372 kcal/100 g) y el grupo Suplementado (OB+S), con una dieta de "cafetería" suplementada con kaempferol-3-*O*-glucósido (15 mg/kg) y narirutina (30 mg/kg) durante el periodo perinatal (10 semanas). Treinta ratas Wistar machos crías: grupo Control (n=12), grupo Cafetería (n=9) y Suplementado (n=9), fueron alimentadas con dieta estándar a partir de la semana 3 de vida. El peso corporal fue registrado una vez por semana. A la semana 16 de vida las ratas fueron sacrificadas, se recolectó la sangre y se extrajo el hígado para posteriores análisis.

Se obtuvo el ARN de los hígados de 13 ratas Wistar macho; grupo Control (n=4), OB (n=5) y OB+S (n=4), utilizando un kit comercial (RNeasy QIAGEN). Se sintetizó ADNc a partir del ARN utilizando la enzima retroviral (RT) del kit Applied Biosystems. Posteriormente, se realizaron los ensayos de RT-qPCR, empleando sondas TaqMan específicas para los genes *GCK*, *FASN*, *SOCS3* y *HPRT1* (gen control). Los resultados fueron analizados por medio del método Pfaffl que calcula la expresión relativa tomando en cuenta las eficiencias de los genes.

Resultados

La suplementación dietética con flavonoides disminuyó la ganancia de peso y mejoró la sensibilidad a la insulina en la descendencia adulta de ratas Wistar alimentadas con dieta de cafetería. Se encontró una diferencia significativa en la expresión de *GCK* hepático entre los grupos OB y OB+S ($p < 0.0001$).

Conclusiones

La suplementación dietética con flavonoides durante la etapa perinatal, podría prevenir el desarrollo de la obesidad y mejorar la sensibilidad a la insulina a través de la regulación de la expresión de *GCK* en el hígado de la descendencia adulta.

ABSTRACT

Introduction

The environmental impacts on maternal nutrition during embryogenesis can leave a "nutritional impression" with long-term effects in the promotion of obesity and related conditions in adulthood. However, bioactive compounds have been identified that can exert a preventive effect in the development of obesity.

Aim

To determine the effect of narirutin and kaempferol-3-*O*-glucoside on metabolic parameters in the offspring of female rats fed an obesogenic diet during the perinatal period.

Materials and methods

Control group rats were fed standard diet (335 kcal / 100g); the Cafeteria group, with a "cafeteria" diet (372 kcal / 100 g) and the Supplemented group, with a "cafeteria" diet supplemented with kaempferol (15 mg / kg) and narirutin (30 mg / kg) during the perinatal period. Thirty Wistar rats male offspring: Control group (n = 12), Cafeteria group (n = 9) and Supplemented (n = 9), were fed standard diet after breastfeeding. Body weight was recorded once a week. At week 16 the rats were sacrificed, blood was collected, and the liver removed for further analysis.

RNA was obtained from the livers of 13 male Wistar rats; Control group (n = 4), Cafeteria (n = 5) and Supplemented (n = 4), using a commercial kit (RNeasy QIAGEN). cDNA was synthesized from the RNA using the retroviral enzyme (RT) from the Applied Biosystems kit. Subsequently, the RT-qPCR assays were performed, using specific TaqMan primers (*GCK*, *FASN*, *SOCS3* and *HPRT1* (control)). The results were analyzed by the Pfaffl method that calculates the relative expression taking into account the efficiencies of the genes.

Results

Dietary supplementation with flavonoids decreased weight gain and improved insulin sensitivity in the adult offspring of Wistar rats fed obesogenic diet. A significant difference was found in the liver expression of GCK (p <0.0001) related to glucose metabolism between Cafeteria and Supplemented groups.

Conclusions

Dietary supplementation with flavonoids during the perinatal period, could prevent the development of obesity and improve the insulin sensitivity through the regulation of GCK expression in the liver of adult offspring.

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La obesidad es una enfermedad crónica que se caracteriza por el almacenamiento excesivo de grasa en el tejido adiposo (Pan, Lai, & Ho, 2010). El constante aumento de dicha enfermedad la describe como una epidemia a nivel mundial (Ng, Fleming, Robinson, Thomson, & Graetz, 2014). Según la Organización Mundial de la Salud, en el 2014 se registraron 1.9 billones de personas mayores de 18 años con sobrepeso, de las cuales, 600 millones presentaban obesidad (“WHO | Obesity and overweight,” 2016). La obesidad es causada por múltiples factores, siendo el desbalance energético el más importante. Además, una compleja interacción entre la genética, el medio ambiente y la alimentación pueden ser otras causas del rápido incremento de la obesidad (Drazen, 2015).

Numerosos estudios han comprobado el papel que ejerce el componente genético sobre la alimentación y viceversa, tomando suma importancia el efecto de la alimentación prenatal y postnatal en el recién nacido (Huang & Hu, 2013). La nutrición materna se considera un importante estímulo que regula el crecimiento y la programación metabólica (De Boo & Harding, 2006). Durante las primeras etapas de la vida, la alimentación materna puede afectar el desarrollo embrionario causando cambios permanentes en la fisiología y metabolismo del ser humano (Willyard, 2014).

Diversos estudios apoyan la hipótesis de programación metabólica en relación con los procesos de la enfermedad, utilizando modelos animales que han sido expuestos a una sobrealimentación (Langley-Evans & McMullen, 2010). Estos modelos animales han evidenciado diversos cambios relacionados con parámetros antropométricos, bioquímicos y genéticos de la progenie cuando se le alimenta a la madre con una dieta rica en grasa (King et al., 2013). Según Lagisz et al., 2015, la exposición materna a dietas hipercalóricas o altas en grasa durante la gestación y lactancia en roedores, predispone a su descendencia a tener un peso mayor en la vida adulta.

Por esta razón es necesaria la búsqueda de compuestos naturales que tengan la capacidad de realizar diversas actividades biológicas que impacten de manera positiva en el estado de salud del ser humano (Molyneux, Lee, Gardner, Panter, & James, 2007). Los flavonoides son metabolitos bioactivos encontrados en diversos alimentos que pueden influenciar procesos celulares y genéticos (Kumar & Pandey, 2013). En particular, la naringenina-7-*O*-rutinósido y el kaempferol-3-*O*-glucósido han mostrado actividades anti-obesidad y anti-diabética al reducir la ganancia de peso, los niveles de glucosa y ácidos grasos en sangre mejorando la señalización de insulina (Calderón-Montaño, Burgos-Morón, Pérez-Guerrero, & López-Lázaro, 2011; Zang et al., 2015).

Es por esto que la comprensión de los mecanismos implicados en el efecto que los flavonoides pueden ejercer sobre parámetros antropométricos, bioquímicos y la expresión de genes en la descendencia de madres suplementadas con dichos compuestos, es crucial para el desarrollo de nuevas estrategias y terapias dirigidas hacia la prevención de la obesidad y enfermedades metabólicas relacionadas (Parks et al., 2013).

II. ANTECEDENTES

2.1 Obesidad

La obesidad se define como un exceso de tejido adiposo causada por múltiples factores, producto de la interacción entre ambiente (estilos de vida, hábitos alimenticios) y genotipo (Hruby & Hu, 2015). Aunque la etiología de la obesidad es multifactorial, uno de los factores más importantes se le atribuye al desbalance entre el consumo y gasto energético (Y. Zhang et al., 2014). Actualmente, el criterio más utilizado para clasificar la obesidad es el índice de masa corporal (IMC) calculado como peso corporal en kilogramos dividido por la altura en metros cuadrados. La clasificación de IMC varía desde bajo peso ($<18.5 \text{ kg/m}^2$) a obesidad grave o mórbida ($\geq 40 \text{ kg/m}^2$). En el caso de la obesidad, se clasifica desde $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ (Nuttall, 2015).

En el mundo se estima que la obesidad afecta aproximadamente a más de 600 millones de personas, sobre todo en países donde hay un nivel alto de clase media como en Europa del este, Latinoamérica y Asia (Verma & Hussain, 2016). En la Figura 1 y 2 se puede observar que los países de Estados Unidos, Canada, Australia, México, entre otros; tienen un mayor porcentaje de personas con obesidad (World Obesity Federation, 2015). Se estima que para el 2030 habrá 1.12 billones de personas con obesidad en el mundo (Kelly, Yang, Chen, Reynolds, & He, 2008).

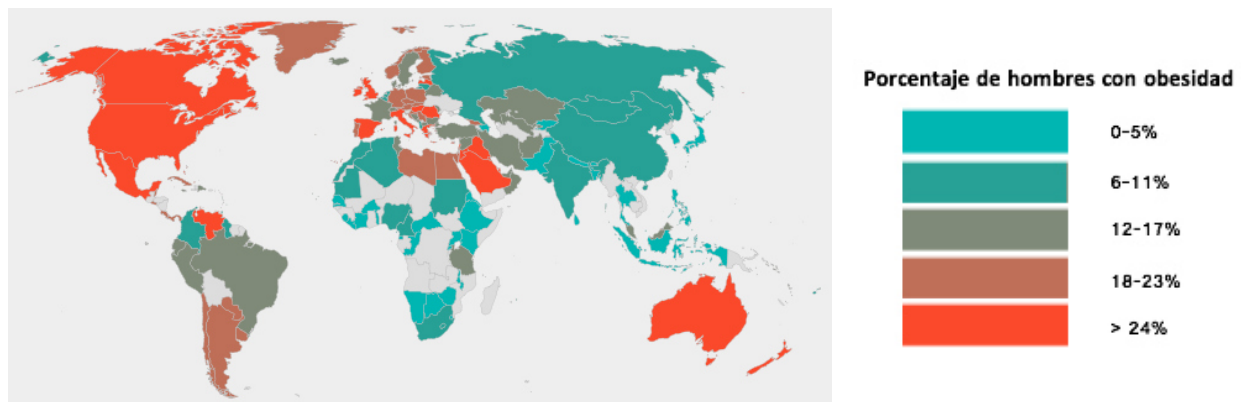


Figura 1. Porcentaje de hombres con obesidad a nivel mundial (World Obesity Federation, 2015)

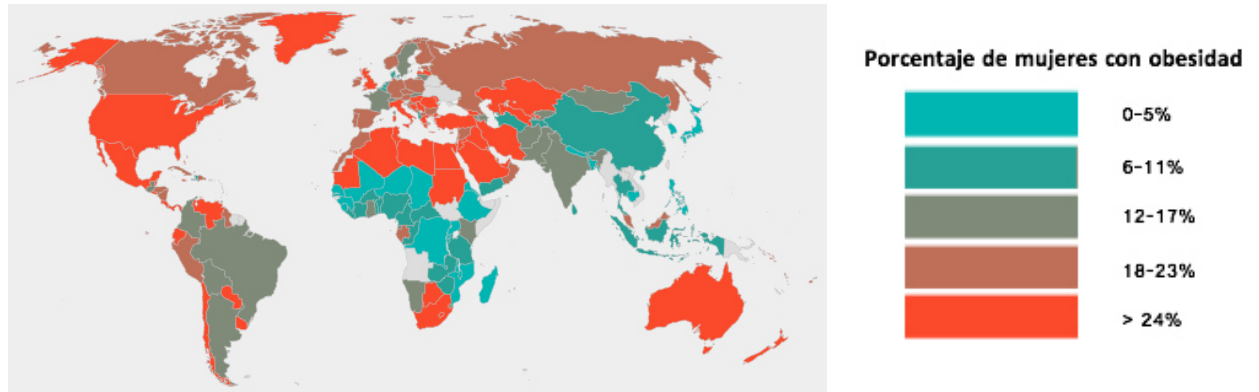


Figura 2. Porcentaje de mujeres con obesidad a nivel mundial (World Obesity Federation, 2015).

En México la prevalencia de sobrepeso y obesidad en individuos mayores de 20 años fue de 72.5% en el 2016, comparado con el 2012 que se encontraba en 71.2% (Hernández et al., 2016) (Figura 3). Otros resultados mostraron que los hombres son más altos, tienen mayor IMC y circunferencia de cintura que las mujeres, sin embargo, las mujeres presentaron mayor prevalencia de obesidad y adiposidad (Lopez-Ortega & Arroyo, 2016).

Prevalencia de sobrepeso y obesidad* en población de 20 o más años de edad, en la ENSANUT 2012 y ENSANUT MC 2016.

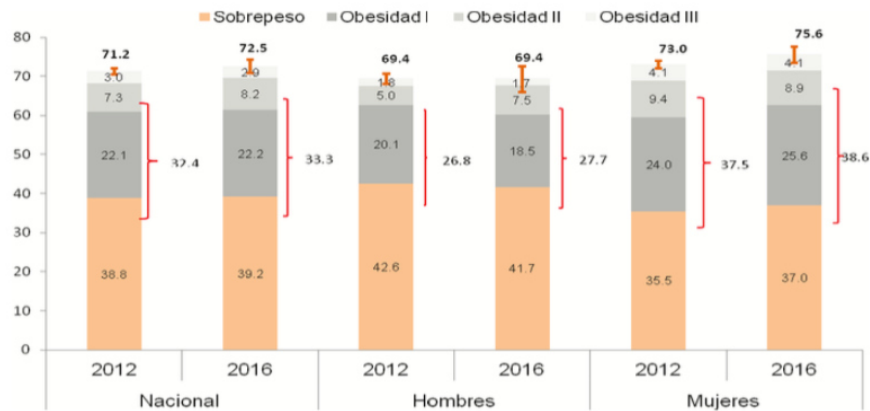


Figura 3. Prevalencia nacional de sobrepeso y obesidad en población adulta (Hernández et al., 2016).

La patofisiología de la enfermedad comienza cuando la nutrición, inactividad física, factores ambientales y la susceptibilidad genética causan un acúmulo excesivo de depósitos de grasa (Algoblan, Alalfi, & Khan, 2014). Las células grasa conocidas como adipocitos secretan energéticamente una mezcla

de productos que vinculan la obesidad con comorbilidades asociadas como la diabetes. La infiltración de macrófagos es particularmente prominente en el tejido adiposo de individuos con obesidad (Weisberg et al., 2003). La proteína atrayente-quimio-monocitos (MCP-1) derivada del tejido adiposo es una quimioceína que exhibe propiedades quimiotácticas en células inflamatorias que son factores clave para inducir la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo (Yu, Kim, Kwon, & Kawada, 2006). MCP-1 desencadena esta infiltración y la posterior liberación del mediador inflamatorio, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) que dificulta la señalización de insulina y estimula la lipólisis de los ácidos grasos en los adipocitos (Wozniak, Gee, Wachtel, & Frezza, 2009). El TNF- α y otras citocinas proinflamatorias incluidas interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 β (IL-1 β) y la proteína C-reactiva (PCR), están implicadas en la inflamación crónica y la resistencia a la insulina (Maury et al., 2007)

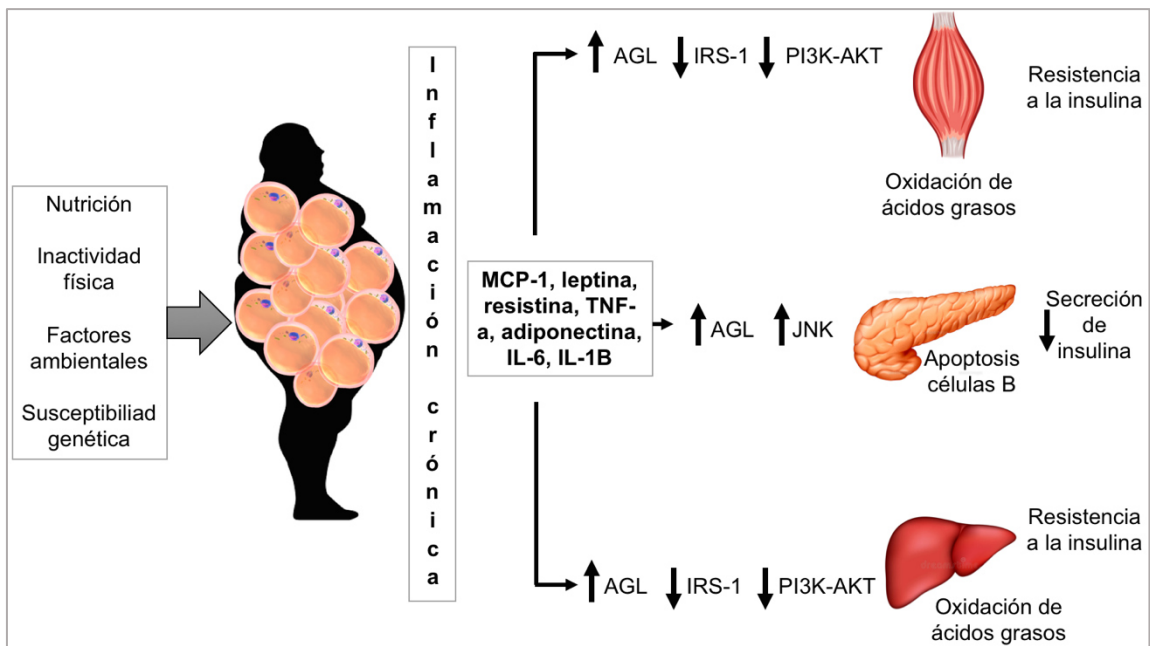


Figura 4. Diagrama esquemático del vínculo entre la obesidad y la diabetes, así como sus efectos en el músculo esquelético, el hígado y el páncreas al estimular diferentes citocinas inflamatorias, enzimas metabólicas y vías de señalización. Adaptado de Kawser Hossain et al., 2016.

Se ha reportado que las citocinas inflamatorias inhiben la síntesis de triglicéridos regulando negativamente el receptor activado de proliferación de los peroxisomas gamma (PPAR γ), la lipasa de lipoproteína plasmática (LPL), así como el transportador de glucosa tipo 4 (GLUT-4) (Guilherme, Virbasius, Puri, & Czech, 2008). Simultáneamente, el TNF- α aumenta la lipólisis provocando un aumento en la liberación de ácidos grasos libres (AGL). Este aumento reduce la expresión del receptor de insulina 1 (IRS-1), alterando la activación de la señalización de fosfatidilinositol-3-quinasa – serina/treonina quinasa (PI3K-AKT) en el hígado y los músculos esqueléticos induciendo un aumento en la expresión de la señalización de quinasa c-Jun N-terminal (JNK) en el páncreas (Kawser Hossain et al., 2016a). La expresión reducida de PI3K-AKT causa resistencia a la insulina en el hígado y la expresión aumentada de JNK agrava la apoptosis en el páncreas. Por último, la resistencia a la insulina causa un aumento en la producción de glucosa y una disminución en la captación de ésta, lo que conlleva a una hiperinsulinemia (Alsadat et al., 2015).

México enfrenta un problema mayor en salud pública debido a los altos niveles de prevalencia de sobrepeso y obesidad. El costo para cubrir los efectos de estas enfermedades oscila entre 82 a 98 mil millones de pesos (Instituto Mexicano para la Competitividad A.C., 2015). Los efectos económicos de estas enfermedades no son solo por el hecho de que la persona tenga un cúmulo de grasa mayor, sino por la consecuencia en la salud de los individuos (Rtveladze et al., 2013).

En el 2008, las enfermedades no transmisibles generadas por un exceso de grasa corporal como la diabetes o enfermedades cardiovasculares ocasionaron la muerte de 36 millones de personas en el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que para el 2030 esta cifra aumente a 55 millones (Organización Mundial de la Salud, 2013). Claramente la epidemia de la obesidad es un problema de salud de importancia mundial, no solo con un profundo impacto en la edad adulta sino también en grupos

vulnerables como en la etapa materno-infantil (Tenenbaum-Gavish & Hod, 2013).

Así mismo, la obesidad materna es un problema grave que en pocos años ha cobrado suma importancia por las consecuencias que está generando en la salud, tanto en la madre como en la descendencia, y el mal pronóstico que se ha comprobado al no intervenir de manera temprana (Moraga M., Rebollo G., Bórquez V., Cáceres D., & Castillo D., 2003). La obesidad materna se diagnostica por un IMC mayor de 30 kg/m² en la primera consulta prenatal (Di Marco, Flores, Naddeo, Bustamante, & Abrahan, 2011).

En el mundo, la prevalencia de sobrepeso y obesidad en mujeres en edad fértil ha ido en aumento, por ejemplo, en Inglaterra en el año 2013, el 18% y 26% de las mujeres entre 25-34 años y 35-44 años, respectivamente, se diagnosticaron con obesidad (Moody, 2014). En Estados Unidos, la prevalencia de obesidad en mujeres embarazadas aumentó un 9% en el periodo de 1993 al 2003 (Meehan, Beck, Mair-Jenkins, Leonardi-Bee, & Puleston, 2014). En México, las mujeres que se encuentran en edad fértil y con sobrepeso u obesidad varían entre 26 al 38%. En Chihuahua, por ejemplo, las mujeres embarazadas con sobrepeso y obesidad representan el 29 y 31%, respectivamente (Flores-Padilla, Solorio-Páez, Melo-Rey, & Trejo-Franco, 2014).

Las alteraciones metabólicas que puede ocasionar la obesidad en la etapa gestacional son numerosas, tanto para la madre como para su descendencia (Farías, 2013). Estos efectos originan en la madre abortos espontáneos, hipertensión gestacional, pre-eclampsia o diabetes gestacional, entre otros (Hashmi, Soomro, Iqbal, Soomro, & Saleem, 2012). Por otra parte, en el feto puede ocasionar defectos en el tubo neural, crecimiento excesivo o macrosomía e inclusive la predisposición genética de adquirir las enfermedades que caracterizan a la obesidad (Guelinckx, Devlieger, Beckers, & Vansant, 2008).

Recientemente, esta predisposición genética ha adquirido interés entre los investigadores ya que se ha comprobado que la nutrición en la etapa gestacional puede regular la expresión de genes durante la embriogénesis, lo cual se conoce como programación metabólica (Ruager-Martin, Hyde, & Modi, 2010).

2.2 Programación metabólica

En 1990, el investigador Barker llegó a una conclusión que le dio otra perspectiva a la obesidad infantil al suponer que las influencias adversas tempranas en el desarrollo, particularmente durante la vida intrauterina, pueden dar lugar a cambios permanentes en la fisiología y el metabolismo, lo que resulta en un mayor riesgo de enfermedad en la edad adulta (Barker, 2002).

A pesar de que la hipótesis de Barker originalmente se centró en el bajo peso al nacer, existe evidencia de que un peso mayor al nacer puede ocasionar una serie de complicaciones en la salud durante la edad adulta (Leddy, Power, & Schulkin, 2008). Esta hipótesis llamada “Los orígenes del desarrollo de la salud y enfermedad” marca la pauta de lo que hoy conocemos como programación metabólica. La programación metabólica es el proceso por el cual un estímulo, durante un período sensible o crítico, tiene efectos irreversibles a largo plazo en el desarrollo (Hoche, 2014).

Un mecanismo que se cree juega un papel importante durante la embriogénesis son los estímulos nutricionales. La nutrición fetal es un regulador clave para el crecimiento embrionario y, por lo tanto, un candidato como posible influencia de dicha programación (Perrone et al., 2016). La nutrición en la etapa gestacional depende de la función placentaria normal y de la apropiada nutrición materna por lo que una dieta sana y variada es importante para proporcionar suficiente energía y nutrientes, tanto para la madre como para el feto (Gluckman, Hanson, Cooper, & Thornburg, 2008). Sin embargo, los cambios estructurales y fisiológicos que se producen por una nutrición fetal errónea pueden “imprimir una memoria” permanente a lo largo de

la vida por patrones alterados de expresión génica provocando afectaciones en la salud de la descendencia en etapas de desarrollo posteriores (Bloomfield, Spiroski, & Harding, 2013, Bernal & Jirtle, 2010).

Por otro lado, el feto debe de adaptarse al suministro de nutrientes que cruzan la placenta, ya sea un déficit o una sobreabundancia, desencadenando cambios permanentes en la fisiología y metabolismo. Por lo tanto, la sobrenutrición de la madre puede dar lugar a adaptaciones del desarrollo en el feto con cambios permanentes en la estructura, fisiología y metabolismo, predisponiéndolo a enfermedades crónico-degenerativas en la vida adulta (J. Wang et al., 2012). Desafortunadamente, los mecanismos exactos para explicar la interacción entre la nutrición y el desarrollo fetal están lejos de ser claros, sin embargo, se ha avanzado en el conocimiento de estos mecanismos con estudios epidemiológicos, modelos de placenta y experimentos con animales (Williams, Mackenzie, & Gahagan, 2014).

2.3 Modelo animal

Los intrincados factores ambientales y genéticos son parte fundamental del problema de la obesidad, por lo que se ha vuelto prioridad prevenir y revertir esta enfermedad. Para estudiar la interacción entre dichos factores y la obesidad, los investigadores trabajan con diferentes especies de animales (Kleinert et al., 2018).

Existen dos tipos de modelos animales: los no mamíferos y los mamíferos. Los primeros tienen la ventaja de un bajo costo de mantenimiento, un ciclo de vida corto y la disponibilidad para la edición de genes. Sin embargo, su valor de estudio es limitado debido a que su anatomía y fisiología son distintas al ser humano (Coppola & Moshé, 2012). Por el contrario, la fisiología de los modelos animales grandes, el perro, cerdo y primates no humanos, es similar a la fisiología humana. No obstante, estas especies tienen altos costos de mantenimiento y largos ciclos de vida. Además, dado a que cada madre

produce solo un número bajo de crías durante su vida, estos modelos no son deseables para experimentos a gran escala (Moran et al., 2016).

Los roedores pequeños, especialmente el ratón de laboratorio, representan un buen compromiso entre el rendimiento y la fisiología. Su popularidad se debe a una fisiología más cercana a la de los humanos que los modelos no mamíferos; además de su tamaño pequeño, alta fecundidad y ciclo de vida corto, junto con la relativa facilidad para el estudio de su genoma (Ericsson, Crim, & Franklin, 2013).

Existen diversos modelos animales, utilizando ratas o ratones, para estudiar la obesidad, los más importantes se dividen en dos grupos, el modelo monogénico y el poligénico, y su elección dependerá de la meta del estudio (Nilsson, Raun, Yan, Larsen, & Tang-Christensen, 2012). Dentro del modelo monogénico se encuentran diferentes grupos de ratones genéticamente modificados como, por ejemplo, ratones ob/ob o db/db que presentan deficiencia en la producción de leptina o mutación en el receptor de la leptina, respectivamente (Lutz, Thomas A. and Woods, 2012). Otro grupo que muestra alteraciones genéticas son las ratas Zucker ya que presentan hiperfagia como también una disminución en el gasto energético promoviendo la obesidad (Nilsson et al., 2012).

Por otro lado, los modelos inducidos por la dieta se utilizan a menudo para estudiar las causas poligénicas de la obesidad (Alfaradhi & Ozanne, 2011). Se cree que este grupo de roedores imitan de una mejor manera el estado obesogénico en seres humanos que la mayoría de los modelos genéticamente modificados (Rosini, Ramos da Silva, & de Moraes, 2012). Dependiendo del objetivo del estudio, los modelos inducidos por la dieta pueden variar en cuanto a la cantidad y calidad de macronutrientes y micronutrientes.

La dieta alta en grasa es un tipo de modelo de alimentación en el que los investigadores inducen la obesidad al modificar el porcentaje en la ingesta de grasa (Warden & Fisler, 2008). La característica del estudio dependerá del porcentaje que el investigador usó y puede variar desde un 13% hasta un 85% del total de calorías (Hariri & Thibault, 2010). Igualmente, el tipo de grasa puede variar entre manteca, aceite de oliva, aceite de coco o aceite de pescado dependiendo del objetivo del estudio (Hariri & Thibault, 2010). En los últimos 20-30 años se han estudiado las respuestas que caracterizan las ratas expuestas a dietas ricas en grasas, demostrando que producen mayor peso corporal (C.-Y. Wang & Liao, 2012).

La dieta de cafetería es el segundo tipo de dieta que igualmente induce la obesidad, sin embargo, sus proporciones de macronutrientes difieren en comparación a la dieta rica en grasa (King, Norman, Seckl, & Drake, 2014). Un ejemplo es la composición nutricional de las dietas utilizadas en la investigación de Boqué et al., 2009 (Tabla 1). La ventaja de este enfoque es que la dieta es apetecible y la propensión a comer en exceso es mayor que la de una dieta estandarizada y predefinida como la dieta alta en grasas. Además, este tipo de dieta se asemeja a la situación de la dieta humana occidental (Rkhzay-Jaf, O'Dowd, & Stocker, 2012).

Hoy en día se realizan investigaciones utilizando este modelo animal para la comprensión de la obesidad ya que diversos estudios han demostrado que este tipo de dieta es irreversible a nivel metabólico. Una vez que los animales han tenido cambios como un aumento de peso y grasa corporal, los efectos no se logran corregir a pesar de que se les elimine la dieta de cafetería (S. A. Bayol, Simbi, Bertrand, & Stickland, 2008; Stéphanie A. Bayol, Simbi, & Stickland, 2005).

Tabla 1

	Control	Cafetería 267kcal/100g	Alta en grasa 288kcal/100g	Alta en azúcar 339kcal/100g
Lípidos	17%	45%	60%	19%
Proteína	10%	20%	16%	12%
Hidratos de carbono	73%	35%	24%	69%
Azúcares simples	7%	17%	4.5%	42%

Composición de las dietas

Indudablemente, el uso de modelos animales ha proporcionado un enfoque complementario a los estudios epidemiológicos y clínicos. Actualmente, los modelos inducidos por la dieta han sido de gran ayuda para estudios de modelos animales transgeneracionales, ya que se pueden analizar las influencias ambientales en las siguientes generaciones (Nagy & Turecki, 2015). Los resultados han ayudado a la comprensión de los mecanismos de la programación metabólica, sin embargo, es importante tomar en cuenta diversos factores (Ribaroff, Wastnedge, Drake, Sharpe, & Chambers, 2017). Primero, la duración del periodo de desarrollo a estudiar: prenatal, postnatal o perinatal, debido a que la vulnerabilidad del feto es diferente entre los tres tiempos de desarrollo. Segundo, es importante tomar en cuenta el efecto específico según el género del animal (Nathanielsz, Poston, & Taylor, 2007).

El estudio epidemiológico sobre la hambruna holandesa de 1944 a 1945 observó cómo la desnutrición materna durante la gestación influye en la probabilidad de desarrollar obesidad en la edad adulta (Lumey et al., 1993). Lo importante a destacar de este estudio fueron los tiempos de exposición a la desnutrición. Aquellos con exposición a la hambruna prenatal durante los primeros dos trimestres tuvieron una prevalencia de obesidad 2 veces mayor que los controles. Por el contrario, los expuestos a hambruna prenatal durante el tercer trimestre y postnatal (durante los primero tres a cinco meses de vida), tenían aproximadamente la mitad de probabilidades de desarrollar obesidad que los controles (Parlee & MacDougald, 2014).

Igualmente, se ha desarrollado una variedad de modelos animales con ratas donde se ha observado diferencias en el peso al nacer de las crías dependiendo del tiempo de exposición a la dieta obesogénica. Samuelsson et al., 2008, alimentaron a ratas con dieta alta en grasa, azúcar y sal durante la etapa perinatal obteniendo una descendencia que ganó significativamente más peso corporal después de la lactancia a comparación con las ratas madres controles alimentadas con dieta estándar. Sin embargo, Bayol, et al., 2008, menciona que el aumento de peso corporal materno antes de la concepción no es un requisito para los efectos de las dietas que inducen obesidad. La inducción de la dieta obesogénica durante la gestación y lactancia, sin incluir antes de la concepción, produce descendencia con mayores medidas de adiposidad y un mayor peso corporal después de la lactancia (Sampey et al., 2011).

La expectativa de muchos modelos inducidos por la dieta es el prevenir y/o revertir enfermedades crónicas no transmisibles como la obesidad, específicamente en la etapa materno-infantil. En los últimos años se ha señalado la relación de una dieta saludable sobre la protección de enfermedades crónico-degenerativas (Batra & Sharma, 2013). Investigadores se han interesado en alimentos que contengan compuestos bioactivos ya que pueden proporcionar beneficios a la salud (Crozier, Jaganath, & Clifford, 2009). Así, intervenciones nutricionales que mejoren el medio intrauterino para una mejor programación metabólica podrían tener un impacto para la prevención del desarrollo de la obesidad y enfermedades metabólicas relacionadas como la diabetes y síndrome metabólico.

Con el tiempo, la relación entre la dieta y la salud ha despertado gran interés, ya que la nutrición puede prevenir y tratar varias enfermedades. La obesidad se ha convertido en uno de los principales problemas de salud pública en todo el mundo y sus causas son complejas y multifactoriales (Peña-Romero, Navas-Carrillo, Marín, & Orenes-Piñero, 2017). El estudio de la interacción entre el gen y la ingesta de nutrientes se ha convertido en una herramienta

prometedora para el manejo de la obesidad (Doo & Kim, 2015). Numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* respaldan los efectos beneficiosos de los flavonoides dietéticos en la regulación de la digestión de los hidratos de carbono, la deposición adiposa, la liberación de insulina y la captación de glucosa en tejidos que responden a la insulina a través de vías de señalización celular para la prevención y tratamiento de la obesidad (Lee, Kang, & Cho, 2007).

2.4 Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de sustancias naturales pertenecientes a una clase de metabolitos secundarios que tienen como característica una estructura química polifenólica (Toh, Tan, Lim, Lim, & Chong, 2013). Este grupo se caracteriza por un núcleo aromático, ampliamente distribuido en plantas, frutas y vegetales, donde juegan un papel importante en su pigmentación, sabor y aroma (Beecher, 2003). En la Europa occidental se ha estimado un consumo de 100 a 1000 mg de flavonoides al día por persona, mientras que en Estados Unidos la ingesta promedio de flavonoides es de 313.26 mg al día (Kozłowska & Szostak-Wegierek, 2014; Zamora-Ros et al., 2010).

Los flavonoides se pueden dividir en diferentes subclases dependiendo del número de carbono donde se une el anillo B con el anillo C y el grado de insaturación y oxidación del anillo C. Generalmente, los flavonoides tienen una estructura común de tres anillos fenólicos (Figura 5) con una configuración de carbono C6-C3-C6 y tomando en cuenta la posición del enlace del anillo aromático se puede dividir en tres tipos: flavonoides (Figura 6A), isoflavonoides (Figura 6B) y neoflavonoides (Figura 6C) (Grotewold, 2006).

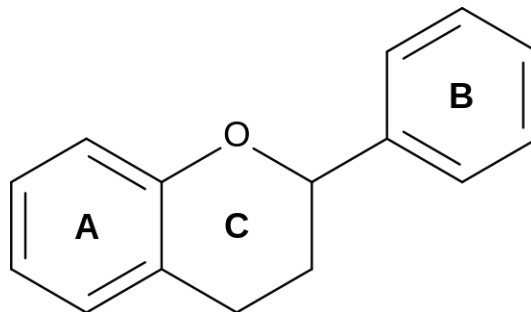


Figura 5. Estructura básica del flavonoide (Vanhees, 2012).

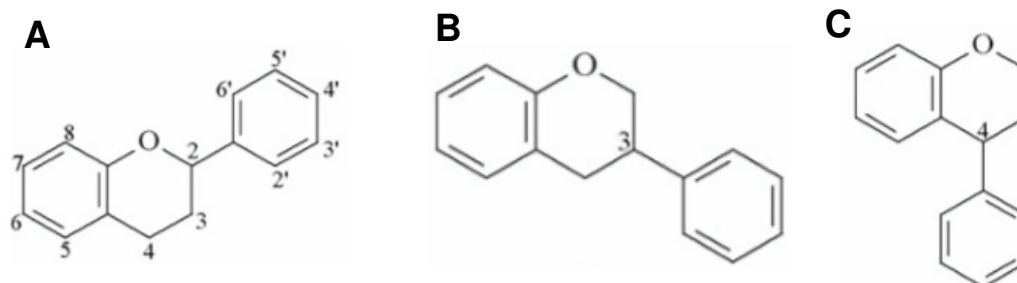


Figura 6. Estructura química de los flavonoides, isoflavonoides y neoflavonoides, respectivamente (Grotewold, 2006).

Además, los flavonoides se dividen en diferentes subclases, cada una con diversos ejemplos de compuestos y fuente alimenticia donde se encuentran abundantemente (Tabla 2) (Panche, Diwan, & Chandra, 2016).

Tabla 2
Flavonoides

Subclases	Estructura química	Ejemplos de compuestos	Fuente alimenticia
Flavona		Apigenina, luteolina	Perejil, apio y especias
Flavanol		Epicatequina, epigallocatequina	Plátano, manzana, mora, durazno
Flavanona		Naringenina, hesperidina	Naranja, limón, uva
Flavonol		Kaempferol, quercetina	Cebolla, tomate, manzana, uva
Antocianina		Malvidina, cianidina	Arándano, uva, frambuesa, fresa
Chalcona		Florentina, arbutina	Tomate, pera, fresa

Igualmente, estos compuestos se pueden dividir en dos categorías: glucosilados o aglicona. La mayoría de los flavonoides se encuentran en forma natural como glucósidos, esto quiere decir que contiene en su estructura química, uno o más residuos de azúcar (Z. Chen, Zheng, Li, & Jiang, 2014). Al momento de ingerirse el glucósido pierde el/los residuo/s de azúcar para ser hidrolizado a su correspondiente aglicona y poder ser absorbido en el intestino delgado o metabolizado por la flora intestinal del colon. Aquellos flavonoides absorbidos se transportan por el torrente sanguíneo para que ejerzan funciones biológicas en diferentes tejidos (Prasain & Barnes, 2007).

La presencia de anillos B, dobles enlaces y grupos hidroxilo les confiere propiedades características estructurales y funcionales importantes (Andersen & Markham, 2006). Dentro de la estructura química existen quelantes de hierro, y otros diferentes metales, que le brinda propiedades benéficas a la salud (Redan, Buhman, Novotny, & Ferruzzi, 2016). Se conoce que los flavonoides ejercen efectos clínicos importantes relacionados a la obesidad y comorbilidades asociadas, entre estos, por ejemplo, el antiinflamatorio. Además se ha comprobado que estos compuestos desempeñan un papel positivo en el mantenimiento de los niveles de glucosa en sangre, la captación de glucosa y la secreción de insulina (Pan et al., 2010).

Se ha comprobado que los efectos benéficos de los flavonoides sobre parámetros antropométricos y bioquímicos subyacen de diversos mecanismos moleculares (Kumar & Pandey, 2013). La nutrigenómica busca elucidar cómo los componentes de una dieta en particular, en este caso los compuestos bioactivos, pueden afectar mecanismos moleculares, como por ejemplo la expresión de genes, ya sea aumentando o suprimiendo su potencial (Sales, Pelegrini, & Goersch, 2014a).

2.5 Flavonoides y mecanismos moleculares

La genómica se puede definir como el enfoque que describe el mapeo, la secuenciación y el análisis de todos los genes presentes en el genoma de una especie determinada (Ouhtit, 2014). La increíble cantidad de información comprendida dentro de un genoma determinado ha llevado a la creación de otras áreas genómicas, cada una con un objetivo específico (Kussmann, Raymond, & Affolter, 2006). La nutrigenómica busca y explica cómo la dieta (nutrientes) puede regular los genes (Sales, Pelegrini, & Goersch, 2014b). El reconocimiento de que los nutrientes tienen la capacidad de interactuar y modular los mecanismos moleculares subyacentes a las funciones fisiológicas de un organismo ha provocado una revolución en el campo de la nutrición (Pavlidis, Patrinos, & Katsila, 2015).

La nutrigenómica proporciona enfoques poderosos para desentrañar la compleja relación entre moléculas nutricionales y el sistema biológico como un todo (Neeha & Kinth, 2013). El descubrimiento de estas interacciones (gen-nutriente) puede ayudar a la prescripción de dietas personalizadas de acuerdo con el genotipo de cada individuo (Hesketh, 2013). Por lo tanto, será posible mitigar los síntomas de enfermedades existentes o prevenir futuras enfermedades, especialmente en el área de enfermedades crónicas no transmisibles, que actualmente se consideran un importante problema de salud pública mundial (Afman & Müller, 2006).

Los primeros estudios realizados enfocados a nutrigenómica con vitaminas A, D y ácidos grasos han demostrado que pueden desencadenar acciones directas en la activación de los receptores nucleares e inducir la transcripción de genes (Dauncey, 2012). Compuestos bioactivos como el resveratrol presente en el vino y la genisteína de la soja pueden influir indirectamente en las vías de señalización molecular, como el factor kappa B (Rana, Kumar, Rathore, Padwad, & Bhushana, 2016). La participación de estos compuestos en la regulación de genes clave se puede asociar con una

prevención de enfermedades relacionadas con la inflamación como, por ejemplo, la obesidad (Phillips, 2013). Como sabemos, la obesidad es un problema multifactorial y recientemente, la nutrición durante la etapa gestacional ha sido un interesante factor de estudio con respecto a la prevención de la obesidad en la descendencia en la edad adulta (Leddy et al., 2008).

Así, la epigenética surge como una nueva herramienta para estudiar los mecanismos moleculares que pueden alterar el genoma en desarrollo, sin cambiar la secuencia en los nucleótidos. Un entorno intrauterino adverso puede afectar el desarrollo del feto modificando la expresión génica en células que experimentan diferenciación, proliferación o maduración funcional en el momento de una perturbación en la nutrición materna (Gicquel, El-Osta, & Le Bouc, 2008). Actualmente se sabe que al menos hay dos clases distintas de regulación epigenética que pueden heredarse en los cromosomas. En general, las modificaciones más comunes implican acetilación y metilación de residuos de lisina. El aumento de la acetilación induce la activación de la transcripción, mientras que la disminución de la acetilación generalmente induce la represión de la transcripción (Eberle & Ament, 2012). Mientras tanto, la metilación del ADN se asocia con el silenciamiento génico y contribuye a la inactivación del cromosoma X, la impronta genómica y la regulación transcripcional de los genes específicos de los tejidos durante la diferenciación celular (Simmons, 2007). En este sentido, en los últimos años se ha estado estudiando los nutrientes como factores epigenéticos asociados a desórdenes metabólicos.

En el estudio de Dolinoy, Weidman, Waterland, & Jirtle, 2006, la suplementación de genisteína (250 mg/kg de peso corporal) en la dieta materna de ratones dos semanas antes de la concepción, durante la gestación y lactancia, en niveles comparables con los humanos que consumen dietas altas en soya, cambió el color del pelaje de la descendencia (alimentada con dieta

estándar) agouti amarilla viable (A^{vy}) heterocigótica hacia pseudoagouti. Los autores concluyeron que este marcado cambio fenotípico se asoció significativamente con una mayor metilación de seis sitios de citosina-guanina en un retrotransposón cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen Agouti. La extensión de esta metilación del ADN fue similar en los tejidos endodérmico, mesodérmico y ectodérmico, lo que indica que la genisteína actúa durante el desarrollo embrionario temprano. Además, esta hipermetilación inducida por la genisteína persistió en la edad adulta, disminuyendo la expresión ectópica de Agouti y protegiendo a la descendencia de la obesidad. Por lo tanto, se proporcionó la primera evidencia de que la genisteína dietética materna afecta la expresión génica y altera la susceptibilidad a la obesidad en la edad adulta al alterar permanentemente el epigenoma. Actualmente, se han encontrado más genes relacionados a la obesidad que pueden ser regulados por compuestos bioactivos como se describe a continuación.

En el hígado, la glucoquinasa (GCK) es una enzima importante en la absorción de glucosa y la conversión a glucosa-6-fosfato o glucógeno actuando como un determinante sensible a la insulina (He, Yu, Yang, Ge, & Lu, 2016). En el caso de una enfermedad metabólica como la obesidad o la diabetes, el metabolismo de la glucosa hepática presenta tres defectos principales: aumento inadecuado de la producción de glucosa en ayunas, disminución de la supresión de la producción de glucosa mediada por insulina y alteración de la captación de la glucosa (Massa, Gagliardino, & Francini, 2011).

En el estudio de de la Garza et al., 2015, se evaluó la suplementación de helicriso (1 g/kg de peso corporal) y toronja (0.5 g/kg de peso corporal) en comparación con un grupo control y acarbosa (5 mg/kg de peso corporal) en ratones macho diabéticos alimentados con dieta estándar. Los ratones suplementados con ambos extractos tuvieron una disminución significativa en los niveles de glucosa en ayunas. Los autores sugieren que un posible

mecanismo de acción podría ser la regulación positiva de la GCK hepática que resultó estar significativamente aumentada en comparación con el grupo control.

En otro estudio con roedores, Wolfram et al., 2006, suplementaron con epigallocatequina galato (EGCG) de 0.25-1% durante siete semanas, resultando en una disminución de los niveles de glucosa en ratones db/db a comparación con ratones tratados con placebo. Igualmente, los autores discutieron sobre el posible mecanismo que ejerce la suplementación sobre la expresión de GCK. En este caso, los niveles de expresión de ARNm del gen GCK aumentó en los hígados de ratones suplementados de una manera dependiente de la dosis.

La sintasa de ácidos grasos (FAS) es una enzima lipogénica que cataliza todos los pasos de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga, tales como palmitato y estearato, a partir de malonil-CoA y acetil-CoA. FAS es un homodímero de una proteína multifuncional que contiene siete dominios catalíticos y utiliza la fosfopantetina derivada de la vitamina B5 para la catálisis (Chirala & Wakil, 2004).

La concentración tisular de FAS, que se ve afectada por una serie de factores hormonales y dietéticos, es un determinante clave para la capacidad máxima de un tejido para sintetizar ácidos grasos mediante la vía de *novo*. En condiciones de lipogénesis se expresa a niveles elevados en el hígado y tejido adiposo (D. Wang & Dubois, 2012). Dos factores de transcripción, el factor estimulante corriente arriba (USF) y la proteína ligante del elemento regulador de esteroides (SREBP-1), desempeñan un papel dominante en la regulación de la transcripción de FAS (Lenhard, 2011).

El aumento de la expresión del gen FASn en el tejido adiposo está relacionado con la acumulación de grasa visceral, sensibilidad a la insulina alterada, insulina circulante en ayunas aumentada, IL-6, leptina y proteína de

unión a retinol 4 (RBP4), lo que sugiere un papel importante de las vías lipogénicas en la relación causal entre las consecuencias del consumo excesivo de energía y el desarrollo de obesidad y diabetes tipo 2 (Berndt et al., 2007).

El objetivo del estudio de Gracia et al., 2014, fue evaluar los cambios inducidos por una dieta obesogénica en el perfil de metilación de los genes implicados en el metabolismo del triacilglicerol del tejido adiposo, y determinar si este patrón de metilación puede ser alterado por el resveratrol y el pterostilbeno. Las ratas se dividieron en cuatro grupos. El grupo control se alimentó con una dieta estándar comercial, y los otros tres grupos se alimentaron con una dieta comercial alta en grasas y alta en sacarosa (6 semanas): el grupo alto en grasas y alto contenido de sacarosa, el grupo tratado con resveratrol (30 mg/kg/día) y el grupo tratado con pterostilbeno (30 mg/kg/día). Se midió la expresión génica de FASn y ésta aumentó significativamente en ratas alimentadas con dieta obesogénica en comparación con las ratas del grupo control. El resveratrol y el pterostilbeno previnieron este efecto ya que los valores de estos dos grupos fueron significativamente más bajos que el grupo solo alimentado con dieta obesogénica.

El gen supresor de señalización de citocinas (SOCS3) es un miembro de la proteína de la familia CIS/SOCS, un grupo de proteínas caracterizadas por su capacidad para regular negativamente la transducción de citocinas. La familia SOCS esta compuesta por SOCS1 hasta SOCS7 y es codificado por un miembro del inhibidor transductor de señal y activador de la transcripción (STAT) (Torisu et al., 2007). Además de la regulación de la señalización de citocinas, estudios recientes han demostrado que tanto SOCS1 como SOCS3 participan en la regulación de la señalización de la insulina y leptina (Carow & Rottenberg, 2014).

Se ha sugerido que SOCS3 es un biomarcador importante para la detección de efectos inflamatorios característicos de la obesidad ya que en el

estudio de Ueki, Kondo, Tseng, et al., 2004, se observó que la sobreexpresión de SOCS3 en hígado induce resistencia a la insulina *in vivo*, mientras que la supresión de este gen por medio de tratamiento con oligonucleótidos sintéticos (25 mg/kg a la semana por 2 semanas) en ratones diabéticos mejoró la sensibilidad a la insulina.

Por otro lado, los investigadores Wiejak, Dunlop, Mackay, & Yarwood, 2013 analizaron el papel de la naringenina y resveratrol en la expresión del gen SOCS3 a nivel *in vitro*. Con 100 μM , el resveratrol demostró ser un inhibidor eficaz de la proteína SOCS3 y su expresión en células HUVEC. Por el contrario, se descubrió que, con la misma cantidad, la naringenina induce la expresión del gen SOCS3.

2.6 Narirutina (naringenina-7-O-rutinósido)

La narirutina ($\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_{14}$) (Figura 7) perteneciente a la familia de las flavanonas, con un peso molecular de 580.4 g/mol, es un rutinósido que se encuentra abundantemente en los cítricos (National Institute of Health, 2017). La naringenina-7-O-rutinósido se caracteriza por tener una molécula de azúcar que se encuentra en el carbono 7 y la posición de un grupo metoxilo en el carbono 3 o 4 (Di Majo et al., 2005).

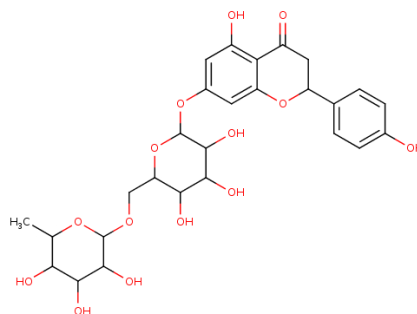


Figura 7. Estructura química de la narirutina (National Institute of Health, 2017).

Después de la ingesta y durante el transporte a través del intestino delgado, la naringenina-7-O-rutinósido sufre una hidrólisis limitada de la unidad O-ramnosa-glucosa (Pereira-Caro et al., 2016). A comparación de los rutinósidos, los glucósidos se absorben en el intestino delgado por medio de la lactasa florizina hidrolasa presente en el borde del cepillo y/o por medio de la B-glucosidasa citosólica en las células intestinales (Borges, Lean, Roberts, & Crozier, 2013). Por el contrario, los rutinósidos no se hidrolizan y cantidades sustanciales intactas alcanzan el colon donde la microbiota juega un papel importante en la desconjugación del resto del azúcar (Bredsdorff et al., 2010).

La naringenina se encuentra abundantemente en los cítricos como toronjas, naranjas y limones, y se ha reportado que tienen propiedades antiinflamatorias (Cheigh, Chung, & Chung, 2012). Mulvihill et al., 2009 estudió el efecto de la suplementación con naringenina (1-3%) *in vivo* en ratas sobre el estado inflamatorio inducido por medio de una dieta obesogénica (42% de grasa) por cuatro semanas. Los resultados mostraron una disminución del colesterol hepático al reducir la síntesis de ésteres de colesterol, la síntesis endógena de ácidos grasos y optimización de la sensibilidad a la insulina y tolerancia a la glucosa.

Otros estudios, (Priscilla, Roy, Suresh, Kumar, & Thirumurugan, 2014; Yoshida et al., 2013) evaluaron el efecto de la suplementación con naringenina (25 mg/kg de peso corporal y 1%, respectivamente) en ratas alimentadas con dieta alta en grasa (58% y 60% de grasa, respectivamente). Yoshida y colaboradores observaron una mejora en los niveles de glucosa y en la disminución de marcadores inflamatorios. Por otra parte, la investigación de Priscilla y colaboradores mostró efectos positivos, con solo 3 semanas de suplementación, al inhibir de manera significativa la actividad de la enzima α -glucosidasa provocando un retraso en la absorción de glucosa resultando en una disminución significativa de glucosa sérica postprandial.

Así mismo, se ha demostrado que en algunos casos los flavonoides compiten con la glucosa en ciertos mecanismos de absorción (Cazarolli et al., 2008). Una reducción en la absorción intestinal de glucosa constituye un posible medio para controlar la hiperglucemia (Kawser Hossain et al., 2016). Tanto la naringina como la naringenina (la forma aglicona de la naringina) se han estudiado ampliamente y se ha encontrado que poseen propiedades anti-obesidad y anti-diabéticas (Goldwasser et al., 2010). En el estudio de Li, Che, Lau, Leung, & Cheng, 2006, la naringenina (500 μ M) mostró una fuerte acción inhibidora en la absorción intestinal de glucosa en ratas de manera competitiva. En el mismo estudio, los autores observaron que la naringenina reduce la captación de glucosa en las vesículas de membrana del borde en cepillo intestinal de ratas diabéticas a un nivel similar al de las ratas normales.

Además de reducir la absorción de glucosa, otro mecanismo posible para controlar los niveles de glucosa en sangre es la inhibición de la actividad α -glucosidasa en el intestino (Zygmunt, Faubert, MacNeil, & Tsiani, 2010). El estudio mencionado anteriormente de Priscilla et al., 2014, demostró las propiedades que posee la naringenina al mejorar la hiperglucemia ya que retrasa la absorción de glucosa al inhibir de manera competitiva la enzima α -glucosidasa de mamífero por la unión en el sitio activo en el intestino.

El estudio de Huong, Takahashi, & Ide, 2006, demostró que el efecto anti-obesidad de la naringenina (suplementación con 1% por 21 días) puede ser debido al aumento de la oxidación de los ácidos grasos en los hepatocitos al aumentar la β -oxidación peroxisomal en ratones. Este compuesto también incrementó notablemente la expresión de varias enzimas requeridas para la oxidación de ácidos grasos en hepatocitos, tales como acetil-coenzima A acetiltransferasas (ACAT), acil-coenzima A oxidasa, carnitina O-octanoil transferasa (COT) como carnitina aciltransferasa de cadena media / cadena larga) y 3-cetoacil-coenzima A.

2.7 Kaempferol (kaempferol-3-O-glucósido)

El kaempferol (C₂₁H₁₉O₁₁) es un compuesto amarillo con 447.372 g/mol de peso molecular (U.S National Library of Medicine, 2017). Este tipo de flavonol (Figura 8) se encuentra abundantemente en té, brócoli, manzanas, fresas y frijoles (Chen & Chen, 2013).

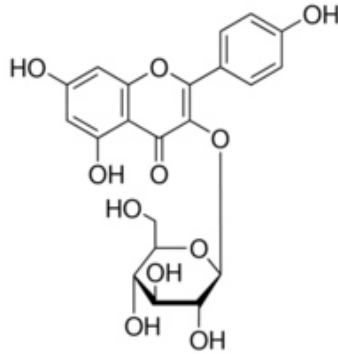


Figura 8. Estructura química de kaempferol (U.S National Library of Medicine, 2017).

Los flavonoles como el kaempferol se ingieren comúnmente como glucósidos. Se sabe que la alta polaridad de los glucósidos dificulta su absorción, mientras que la polaridad intermedia de las agliconas lo facilita (Barrington et al., 2009). Al igual que otros flavonoides, el kaempferol se absorbe principalmente en el intestino delgado. Su absorción puede ser mediante difusión pasiva, pero la evidencia sugiere que también puede ser absorbida por difusión facilitada o transporte activo (An, Gallegos, & Morris, 2011). Los glucósidos de kaempferol son ampliamente metabolizados por la microflora del colon (Landete, 2012). Las bacterias del colon pueden hidrolizar los glucósidos en agliconas y romper el anillo C3 para formar compuestos fenólicos simples tales como ácido 4-hidroxifenilacético, floroglucinol y 4-metilfenol, que pueden ser absorbidos o excretados en las heces (Thilakarathna & Rupasinghe, 2013).

Estas formas conjugadas de kaempferol y algunos compuestos fenólicos producidos por la microflora de colon, pueden llegar a la circulación sistémica y tejidos, y luego ser excretados en la orina (DuPont, Day, Bennett, Mellon, & Kroon, 2004). Se ha observado que el porcentaje de kaempferol excretado en la

orina es del 1.9% y del 2.5% de la cantidad total de kaempferol ingerido (Zabela et al., 2016).

Al igual que la narirutina, el kaempferol-3-*O*-glucósido ha mostrado actividades que benefician el estado inflamatorio provocado por la obesidad (Vinayagam & Xu, 2015). El estudio de Zang, Zhang, Igarashi, & Yu, 2015, utilizó hojas de edamame inmaduro para obtener cuatro glucósidos de kaempferol y administrarlo (0.15%) en ratones alimentados con dieta alta en grasa (30% de grasa) por 92 días. El grupo suplementado tuvo una reducción en el peso corporal, tejido adiposo y niveles de triglicéridos en comparación con el grupo que solamente fue alimentado con la dieta alta en grasa. El tratamiento con kaempferol también disminuyó la glucemia en ayunas y los niveles séricos de HbA1c mejorando la resistencia a la insulina.

Alkhalidy et al., 2015 mostró que la ingesta dietética del flavonol kaempferol (0.05% en la dieta) mejoró significativamente la hiperglucemia, hiperinsulinemia y el perfil lipídico circulante asociándolo con la mejora de la sensibilidad periférica a la insulina en ratones obesos alimentados con una dieta alta en grasa (58% de grasa) por cinco meses. Los autores concluyeron que el uso de este flavonoide como suplemento puede ser benéfico para la prevención de desordenes metabólicos asociados a la obesidad.

El kaempferol reduce la hiperglucemia y mejora la captación de glucosa de forma similar a la acción de la insulina (Jorge, Horst, Sousa, Pizzolatti, & Silva, 2004). Los resultados *in vitro* confirmaron que el tratamiento con kaempferol (10 μ M) promovió la viabilidad celular, reprimió la apoptosis celular y redujo las actividades de caspasa 3 en células β e islotes humanos continuamente expuestos a condiciones hiperglucémicas. Estos efectos defensivos se relacionaron con la expresión mejorada de AKT anti-apoptótica (también conocida como proteína quinasa B (PKB)) y proteínas Bcl-2,

señalización mejorada de cAMP y aumento de la secreción y síntesis de insulina en células β (Al-Numair, Chandramohan, Veeramani, & Alsaif, 2015).

Además, en el estudio de Zanatta et al., 2008, el kaempferol (1 y 100 nM) disminuyó notablemente la glucemia en ayunas y los niveles séricos de HbA1c mejorando la resistencia a la insulina al estimular la captación de glucosa en el músculo de la rata a través de las vías de la PI3K y la proteína quinasa C (PKC) y la síntesis de nuevos transportadores de glucosa.

El estudio de Zang et al., 2015 mencionado anteriormente, analizó la suplementación de kaempferol sobre la expresión génica de PPAR- γ y SREBP-1c en células hepáticas. Los resultados sugirieron propiedades anti-obesidad y anti-diabéticas de este compuesto al regular la expresión de SREBP-1c y la modulación de PPAR- γ a través de la activación de AMPK.

2.8 Flavonoides y programación metabólica

Un hallazgo importante en el campo de la nutrición es descubrir que los componentes de la dieta pueden remodelar el genoma en el útero alterando permanentemente el fenotipo en el organismo adulto (Ruchat, Hivert, & Bouchard, 2013). Cada vez hay más pruebas de que uno de los mecanismos mediante el cual los nutrientes y los compuestos bioactivos afectan los rasgos metabólicos es la epigenética (Choi & Friso, 2010). Las interacciones complejas entre los componentes de los alimentos y las modificaciones de las histonas, la metilación del ADN, la expresión del ARN no codificante y los factores de remodelación de la cromatina conducen a una regulación dinámica de la expresión génica que controla el fenotipo celular (Keleher et al., 2018).

Aunque el período perinatal es el momento de mayor plasticidad fenotípica, contribuyendo en gran medida a la programación del desarrollo, también durante la edad adulta hay evidencia de una influencia nutricional en la regulación epigenética (Kusmann, Krause, & Siffert, 2010). De manera similar

a la diabetes tipo 2, la hipertensión, la aterosclerosis y otros trastornos metabólicos, la predisposición a la obesidad se ha asociado repetidamente a cambios en los patrones epigenéticos que estos a su vez afectan la expresión de un gen (Johnson & Belshaw, 2014).

Un gen es una secuencia específica de ADN que puede traducirse en una proteína. Estas secuencias específicas se componen de diferentes regiones: la región codificadora de la proteína en un extremo del gen y una región reguladora en el otro extremo. Entre estas dos regiones se encuentra un promotor y una secuencia de ADN a la que se puede unir la enzima ARN polimerasa para comenzar la transcripción (Debusk, 2010).

Es dentro de la región reguladora donde se producen la mayoría de las interacciones gen-ambiente y los componentes de los alimentos tienen su principal influencia en la expresión génica. Hasta la fecha se conocen varios genes relacionados con la obesidad que su regulación puede ser influenciada por compuestos bioactivos (Pandey & Rizvi, 2009).

Recientes estudios han investigado sobre el papel del flavonoide en la programación metabólica de modelos experimentales *in vivo* que buscan analizar el efecto en la descendencia (Kataoka, Norikura, & Sato, 2018; Sacco SM 2017; Won, Han, & Kwon, 2017; Jacob S 2017; Ebaid HM 2016; Zhang YB 2015; del Bas et al., 2015; J M Del Bas et al., 2015; Xu, Wu, & Xu, 2014; Sun Y, 2013; Mukai, Sun, & Sato, 2013). La Tabla 3 menciona las características generales de los estudios, así como los principales resultados encontrados.

Tabla 3

Flavonoides sobre la programación metabólica

Extracto/ compuesto	Modelo	Descendencia	Tejido	Resultado	Referencia
Extracto de té verde (compuesto principal epigallocatequina galato)	Durante la gestación y lactancia se alimentó a las ratas hembras con contenido normal de proteína (NP – 20%) o baja en proteína (BP – 8%). Durante la lactancia se suplemento con extracto de té verde (ETV – 0.12 o 0.24%).	Crías macho categorizados en 5 grupos: NP/NG, BP/NG, BP/AG, BP/ETV (0.12%)/AG, BP/ETV (0.24%)/AG por 45 semanas.	Riñón	↓ peso corporal de ambos BP/ETV/AG vs. BP/AG. ↓ expresión TNF-a y PAI-1 de BP/ETV/AG vs. BP/AG.	Kataoka, Norikura, & Sato, 2018
Hesperidina y naringina	Ratones CD-1 fueron alimentados con hesperidina y naringina 5 semanas antes de la gestación y durante la gestación y lactancia.	Crías hembras comieron dieta control por 6 meses.	Hueso	La suplementación con hesperidina y naringina no mejoró la densidad mineral ósea	Sacco SM 2017
Isoflavona vs genisteína	Dos semanas antes de la gestación, gestación y lactancia las ratas hembras fueron asignadas en uno de tres grupos de dieta: caseína (CAS), baja en isoflavonas (ISO) o caseína mas genisteína (GEN).	Crías macho fueron sacrificados en el día 21 postnatal.	Hígado	ISO: ↑ en la proliferación celular. ↓ Apoptosis en células hepáticas. ↑ niveles de homocisteína sérica.	Won, Han, & Kwon, 2017
Fisetina	Ratas Wistar inducidas con Metil-mercurio para desarrollar neurotoxicidad. Se administraron dos dosis de fisetina (10 y 50 mg/kg de peso corporal)	Descendencia de 25 días de vida	Cerebro	Disminuyeron marcadores de estrés oxidativo. Mejora los daños inducidos por la exposición al metil-mercurio en útero	Jacob S 2017
Isoflavonas de soya	Ratas hembras fueron alimentadas con dieta control, dosis baja de isoflavonas (6.5	Ratas hembras de 50 días de vida	Sangre, bazo, timo	Peso relativo del timo disminuyó en el grupo suplementado	Ebaid HM 2016

	g/100 g de dieta) y dosis alta de isoflavonas (26 g/100 g de dieta) durante la gestación			con dosis alta de isoflavonas en comparación con control. También disminuyeron interferón γ e interleucina-12	
Genisteína	32 ratas divididas en: LG grupo (400 mg genisteína/kg dieta) MG grupo (1200 mg genisteína/kg dieta) HG grupo (3600 mg genisteína/kg dieta) y CON grupo sin genisteína, todos alimentados con dieta alta en grasa durante la gestación	Crías de 4 y 8 semanas de vida	Plasma	Correlación entre cantidad de genisteína materna consumida y concentración en plasma de las crías. Reducción de peso en crías macho de grupo HG a la semana 8 en comparación con el grupo CON.	Zhang YB 2015
Extracto de procianidina de semilla de uva (EPSU)	Durante la gestación y lactancia se alimentó ratas hembras con dieta estándar, unas suplementadas con leche condensada baja en grasa (LCBG) o EPSU (25 mg/kg de peso corporal al día).	Crías macho que en el día 30 postnatal fueron alimentados con la misma dieta que sus respectivas madres hasta el día 170.	Hígado y músculo esquelético	EPSU ratas crías presentaron: ↓ HDL ↑ colesterol total:HDL ↑ Abcg1, Abca1, Lxra, Srebp2, Lcat, Scarb1 y Pltp.	del Bas et al., 2015
Extracto de procianidina de semilla de uva (EPSU)	Durante la gestación y lactancia, ratas hembras fueron alimentadas: 2 grupos con dieta estándar, uno suplementado con leche condensada baja en grasa y otro suplementado con EPSU (25 mg/kg de peso corporal al día). Los otros dos grupos fueron suplementados de la misma manera, pero alimentados con dieta alta en grasa.	Las crías macho fueron alimentadas de la misma manera que sus respectivas madres por 30 días.	Hígado y tejido adiposo retroperitoneal, epididimal e inguinal.	Alta en grasa + EPSU: ↑ índice adiposo y peso corporal. ↓ niveles plasmáticos de MCP-1 y glicerol. ↓ cxcl1, cxcl2, ccl11 y ccl3 (genes pro-inflamatorios).	J M Del Bas et al., 2015

Quercetina	Ratas hembras Spregue-Dawley con obesidad inducida por la dieta se les administró 0, 50, 100 o 200 mg/kg de peso de quercetina intragástrica durante la gestación y lactancia	Generación F1 fue alimentada con dieta control después del destete hasta el día 100 de vida.	Sangre, hígado y tejido adiposo	Mejora metabolismo de glucosa, sensibilidad a la insulina, estrés del retículo endoplásmico y la inflamación en la descendencia	Xu, Wu, & Xu, 2014
Extracto de té verde	Ratas madres desnutridas alimentadas con extracto de té verde durante la lactancia	Crías hembras	Riñón	Sobreexpresión de proteína quinasa AMP-activada estimulando la expresión de SIRT1	Sun Y, 2013
Polifenoles del frijol Azuki (PA)	Durante la gestación (G) y lactancia (L) se alimentó a ratas hembras con 3 tipos de dietas: control durante gestación y lactancia, baja en proteína en G y control en L y baja en proteína en G y suplementación AP del 1%.	Sin importar el sexo, la mitad de las crías fueron sacrificadas al terminar la lactancia y la otra mitad continuó con dieta estándar por 23 semanas.	Hígado, riñón y corazón.	Grupo suplementado: ↓ peso corporal y triglicéridos hepáticos. ↑ niveles de adiponectina. ↑ AMPK y ACC. ↓ SREBP-1c.	Mukai, Sun, & Sato, 2013

III. JUSTIFICACIÓN

La importancia de disminuir la incidencia de obesidad en cualquiera de las etapas, pero sobre todo en el periodo del desarrollo embrionario y en la primera etapa de la vida materno-infantil, se ha vuelto una prioridad a nivel mundial (Poston et al., 2016). Los diferentes programas de prevención o tratamientos farmacológicos no han sido eficaces en mejorar dicha tendencia. Es por eso que se deben explorar nuevas áreas para el entendimiento y/o la disminución del sobrepeso y la obesidad (Barquera Cervera, Campos-Nonato, Rojas, & Rivera, 2010).

La realización de esta investigación busca brindar más información a la comunidad científica en relación al efecto de la suplementación materna con flavonoides (naringina y kaempferol-3-O-glucósido) durante la etapa perinatal en la prevención de desórdenes metabólicos inducidos por la dieta en la descendencia adulta. Así mismo, profundizar en mecanismos fisiológicos y moleculares para una mejor comprensión de cómo la alimentación materna impacta en su descendencia a través de la regulación de genes relacionados con el metabolismo de la glucosa, lípidos y resistencia a la insulina (Hajiaghaalipour, Khalilpourfarshbafi, & Arya, 2015; Pu et al., 2012). Los resultados obtenidos en este estudio podrían ser extrapolados a ensayos clínicos permitiendo un enfoque aplicable en materia de salud preventiva.

Actualmente, la obesidad se considera una epidemia a nivel mundial y la principal causa de las enfermedades no transmisibles más comunes. Investigaciones han reportado la suplementación con flavonoides como posible prevención de obesidad en la descendencia de madres que fueron alimentadas con una dieta obesogénica.

IV. HIPÓTESIS

La suplementación dietética con flavonoides (naringina y kaempferol-3-O-glucósido) durante la etapa perinatal, previene desórdenes metabólicos a través de la regulación de la expresión de genes relacionados con el metabolismo de la glucosa, lípidos y resistencia a la insulina en el hígado de la descendencia de ratas Wistar madres alimentadas con dieta obesogénica.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Comprender el efecto de la narirutina y kaempferol-3-*O*-glucósido sobre parámetros metabólicos en la descendencia de ratas hembras alimentadas con una dieta obesogénica durante la etapa perinatal.

5.2 Objetivos específicos

1. Analizar el efecto de la suplementación dietética con flavonoides (narirutina y kaempferol-3-*O*-glucósido) en ratas Wistar hembras alimentadas con una dieta obesogénica sobre parámetros antropométricos y bioquímicos.
2. Evaluar el efecto de la suplementación dietética con narirutina y kaempferol-3-*O*-glucósido durante la etapa perinatal en ratas Wistar hembras, sobre parámetros antropométricos y bioquímicos de ratas Wistar macho crías.
3. Determinar el efecto de la suplementación dietética con narirutina y kaempferol-3-*O*-glucósido durante la etapa perinatal en ratas Wistar hembras, en la expresión de genes relacionados con el metabolismo de la glucosa, lípidos y resistencia a la insulina en el hígado de la descendencia en edad adulta.

VI. METODOLOGÍA

6.1 Diseño experimental

Los objetivos propuestos para el presente proyecto se abordaron a través de un modelo experimental en ratas Wistar en el que se estudió el efecto de la suplementación dietética con naringenina-7-*O*-rutinosido y kaempferol-3-*O*-glucósido sobre la descendencia de ratas Wistar madres alimentadas con una dieta obesogénica rica en grasa y sacarosa.

El modelo experimental se realizó en 6 ratas Wistar hembras de 8 semanas de edad, con un peso aproximado de 250 a 300 g, proporcionadas por Círculo ADN S.A. de C.V. Se aclimataron y se les suministró dieta control por 3 semanas. Todos los animales se mantuvieron alojados en cajas de polipropileno en un ambiente de 21 a 22 °C con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. En la semana 3 experimental, los animales se distribuyeron aleatoriamente en 3 grupos, 2 de control, 2 de dieta de cafetería y 2 de dieta cafetería suplementadas con ambos compuestos bioactivos, empezando con la alimentación en esa misma semana. Durante la semana 6, se colocó una rata macho por jaula para el apareamiento. Al término de esta semana se les retiró la rata macho y continuaron con sus respectivas dietas durante la gestación. El peso de las ratas hembras se registraba 3 veces a la semana y en la semana 13 experimental se evaluó el peso final y la glucosa en ayunas. A continuación, las ratas hembras fueron sacrificadas, se recolectó la sangre y se pesaron el hígado y tejido adiposo mesentérico para posteriormente ser almacenado a -80 °C.

En la semana 10 experimental nacieron las crías de las ratas hembras. En total se tomaron 30 crías macho, 12 crías de las madres en el grupo de dieta control, 9 crías de madres con dieta de cafetería y, por último, 9 crías de madres con dieta cafetería más suplementación. Durante las primeras 3 semanas estuvieron en periodo de lactancia, después se les proporcionó dieta control. Se pesaron una vez por semana y se registró la ingesta tres veces por

semana. Las crías se sacrificaron a la semana 16 de vida, e igualmente que las ratas madres, se registró el peso final, la glucosa en ayunas y por último, se pesó el hígado y tejido adiposo mesentérico de cada rata almacenándose a -80 °C para su posterior análisis.

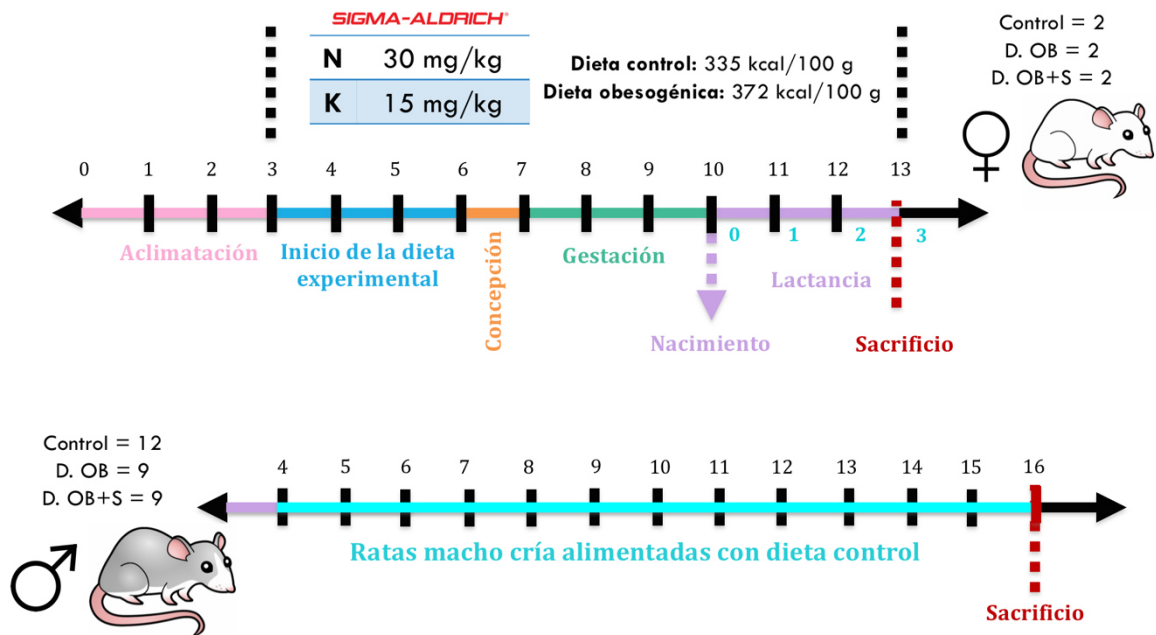


Figura 9. Gráfica del diseño experimental. Seis ratas Wistar hembras fueron aleatoriamente divididas en tres grupos con tres tipos de dietas diferentes durante la etapa perinatal (10 semanas). Al finalizar el periodo de lactancia, treinta crías macho fueron separados de sus madres y alimentados con dieta control por 16 semanas.

6.2 Dieta experimental

El diseño de las dietas experimentales control, cafetería y cafetería con suplementación se constituyen de los siguientes elementos, ver Tabla 4, 5 y 6.

- Ratas madres hembras

Para la dieta control se utilizó Rodent Lab Chow Diet 5001 obtenida por la compañía LabDiet. La dieta de cafetería para inducir obesidad se elaboró a base de chocolate líquido, galletas, tocino, papas fritas, pienso molido y paté, en una proporción 1:1:1:1:1:2, respectivamente. Se molieron todos los ingredientes y se mezclaron para formar una masa homogénea. Todas las dietas fueron otorgadas a libre demanda.

- Ratas crías macho

Se les proporcionó dieta control Rodent Lab Chow Diet 5001 a libre demanda.

Tabla 4

Composición: dieta control

Por cada 100 g	335 calorías
Hidratos de carbono	190.95 calorías
Lípidos	43.55 calorías
Proteína	100.5 calorías

Tabla 5

Composición: dieta de cafetería

Por cada 100 g	372 calorías
Hidratos de carbono	145.08 calorías
Lípidos	182.28 calorías
Proteína	44.64 calorías

Tabla 6

Composición: dieta de cafetería más suplementación

Por cada 100 g	372 calorías
Hidratos de carbono	145.08 calorías
Lípidos	182.28 calorías
Proteína	44.64 calorías
Naringenina-7-O-rutinósido	30 mg/kg/día
Kaempferol-3-O-glucósido	15 mg/kg/día

6.2.1 Flavonoides

Los compuestos bioactivos naringenina-7-O-rutinósido (#SMB00321) y kaempferol 3-O-glucósido (#04500585) fueron obtenidos de la compañía SIGMA-ALDRICH.

6.3 Parámetros bioquímicos

6.3.1 Niveles de glucosa en sangre

La glucosa en ayunas (12 horas) fue medida usando tiras reactivas Accu-check performa (Roche, Cat. 0597270) por punción en la cola de las ratas obteniendo una gota de sangre. La glucosa en sangre fue calculada con "MediSense optium" para registrar el resultado en mg/dL.

6.3.2 Niveles de leptina e insulina séricos

Al final del periodo experimental, las ratas crías fueron sacrificadas por decapitación y una vez recolectada la sangre de las ratas, se coloca en hielo por 30 minutos. Posteriormente se centrifugaron los tubos a 3500 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 4°C, para obtener el suero que fue alicuotado para almacenar en tubos de 0.5 ml y almacenados a - 80 °C para su posterior análisis. Niveles de leptina (Millipore Inc., Cat. EZML-82 K) e insulina (Millipore Inc., Cat. EZRMI-13 K) séricos fueron medidos en las muestras por medio del método de ELISA.

6.3.3 Modelo homeostático para evaluar resistencia a la insulina

Existen métodos diagnósticos de la resistencia a la insulina, ya sea de manera directa o indirecta. El índice HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment) es un método indirecto ya que toma en cuenta la relación de glucosa - insulina en el estado de ayuno (Acosta et al., 2002). El índice HOMA-IR es calculado usando la fórmula:

$$[\text{glucosa en ayunas (mmol/L)} * \text{insulina en ayunas } (\mu\text{U/mL})]/22.5$$

6.4 Cuantificación de la expresión génica

6.4.1 Aislamiento de ARN

En el presente estudio, el aislamiento de ARN se realizó mediante el uso de RNeasy Mini Kit (Qiagen), el cual está basado por el método de adsorción. Esta tecnología combina las propiedades de unión selectiva de una membrana basada en sílice con la velocidad del microspin. El tampón especializado de alto contenido en sal permite que 100 µg de ARN de más de 200 bases se unan a la membrana de sílice del kit. El procedimiento para la extracción se llevó a cabo siguiendo el protocolo del fabricante.

Reactivos

- Columnas QIAshredder
- PBS (tampón fosfato salino)
- Buffer RLT
- Buffer RPE
- Etanol al 70%

Equipamiento

- Microcentrífuga
- Espectrofotómetro (Thermo Scientific NanoDrop 8000)
- Cámara de electroforesis

Procedimiento

Las muestras de hígado de la descendencia se lisaron y se homogenizaron en presencia de un tampón altamente desnaturante que contiene guanidina-tiocianato, que inactiva inmediatamente las RNasas para asegurar la purificación del ARN. Una vez lisado el tejido, se recolectó el contenido de cada muestra por triplicado en tubos Eppendorf y se siguió el protocolo establecido por el kit comercial de Qiagen:

1. Añadir 600 μL de etanol al 70% al ARN diluido y mezclar bien por pipeteo.
2. Transferir la muestra (1.2 mL) a una columna de centrifugación RNeasy Mini ajustadas en un tubo colector y centrifugar a 12,000 rpm durante 15 segundos.
3. Decantar el sobrenadante.
4. Añadir 700 μL de Buffer RW1 a la columna de centrifugación RNeasy. Cerrar la tapa y volver a centrifugar a 12,000 rpm durante 15 segundos.
5. Decantar el sobrenadante.
6. Añadir 500 μL de Buffer RPE a la columna de centrifugación RNeasy y centrifugar a 12,000 rpm durante 15 segundos.
7. Decantar el sobrenadante.
8. Volver a añadir 500 μL de Buffer RPE a la columna de centrifugación RNeasy y centrifugar a 12,000 rpm durante 2 minutos para lavar la membrana.
9. Decantar el sobrenadante.
10. Colocar la columna de centrifugación RNeasy en un nuevo tubo colector y agregar 50 μL de agua libre de RNasas directamente a la membrana de la columna y proceder a centrifugar a 12,000 rpm durante 1 minuto.
11. Almacenar los productos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

6.4.2 Análisis cuantitativo del ARN

El método tradicional para determinar la concentración de ARN es la espectroscopia UV (Sharkey, Banat, & Marchant, 2004). El método se basa en escalar la absorbancia de la muestra de ARN purificada a las longitudes de onda de 260 y 280 nm. La relación de $A_{260}/A_{280} \geq 1.80$ indica una pureza satisfactoria del ARN aislado. Un valor más bajo de la relación indica la presencia de contaminantes, tales como, proteínas y ADN (Vomelová, Vanícková, & Sedo, 2009).

La cantidad y pureza de ARNm aislado se cuantificó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 8000 (Thermo Scientific) a longitudes de onda de

260 y 280 nm. La absorbancia a 260 nm corresponde al pico de absorbancia de los ácidos nucleicos y a 280 nm corresponde al pico de absorbancia de las proteínas.

6.4.3 Retrotranscripción (RT)

El primer paso en un ensayo de RT-qPCR es una reacción de transcripción reversa, la cual consiste en la producción de ADN complementario (ADNc) del ARN de interés a través de la acción de la enzima transcriptasa reversa o retro transcriptasa (RT) (Haddad & Baldwin, 2010). Esta reacción de retrotranscripción se realizó siguiendo el protocolo del kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), que permite la amplificación del ADNc utilizando como cebadores una mezcla de random primers (cebadores de secuencia aleatoria), que amplifican toda la población de ARNs presentes en la muestra.

Reactivos

- Buffer RT 10x
- dNTP's 25 MM
- Random primers
- Multiscribe RT
- Inhibidor de RNasa
- Agua libre de nucleasas

Equipo

- Termociclador (GeneAmp PCR System 2400, Roche)

Procedimiento

Se utilizaron 9 μ L de la mezcla de reactivos antes mencionados en tubos de PCR y se añadieron 11 μ L de muestra de ARN a cada reacción. Los tubos se colocaron en el termociclador, el cual fue programado con el siguiente patrón térmico:

- 25 °C por 5 min (extensión de hexámeros)
- 42 °C por 60 min (síntesis de ADNc)
- 70 °C por 15 min (inactivación de la transcriptasa reversa)

Una vez terminada la retrotranscripción, las muestras se mantuvieron a -20 °C hasta su utilización en la RT-qPCR.

6.4.4 Curvas de eficiencia para el análisis de PCR en tiempo real

Previo a los ensayos por PCR en tiempo real, se hicieron curvas de calibración para calcular la eficiencia de las reacciones. A partir de las muestras de ADNc se hicieron cinco diluciones seriadas para su posterior análisis por PCR en tiempo real. Lo que permite establecer una correlación lineal entre el grado de dilución de la muestra, el cual se expresa como logaritmo en base 10 y los valores de Ct obtenidos.

La eficiencia de las reacciones se determinó a partir de las pendientes de la curva de calibración obtenidas y de acuerdo a la siguiente fórmula (Wittwer, 2001):

$$E = 10 [-1 / \text{pendiente}]$$

Ecuación 1. Fórmula para el cálculo de las curvas de eficiencias de PCR en tiempo real.

6.4.5 RTq-PCR

Para el análisis de PCR en tiempo real, la instrumentación consta de un termociclador, computadora, óptica para la excitación de fluorescencia y la colección de emisiones y software para la adquisición y análisis de datos. El sistema LightCycler (Roche) permite realizar la técnica de RTq-PCR en pequeños capilares, capaces de contener hasta 20 µL de muestra, contenidos dentro de un carrusel tipo rotor que se calienta y enfría por una corriente de aire. Dos de las mayores ventajas que el instrumento ofrece en comparación con otros termocicladores convencionales es la rapidez para la amplificación del producto y que éste puede ser monitorizado en tiempo real (Sharkey et al., 2004).

Reactivos

- TaqMan Gene Expression Master Mix
- TaqMan Gene Expression Assay
- H₂O libre de nucleasas

Equipo

- Termociclador (Light Cycler 480, Roche)

Procedimiento

Una vez obtenido el ADNc de las muestras mediante transcripción reversa, se llevaron a cabo las reacciones de PCR a tiempo real en un termociclador con capacidad para placas de 96 pocillos. En cada uno de ellos se cargaron 10 µl de la siguiente mezcla de reacción:

- 5 µl TaqMan Gene Expression Master Mix
- 0.5 µl TaqMan Gene Expression Assay
- 1 µl ADNc correspondiente a cada muestra
- 3.5 µl H₂O libre de nucleasas

Una vez cargadas las placas, se llevaron al termociclador y se incubaron siguiendo el protocolo:

- 50°C por 2 min (incubación de UDG, sugerido por el kit)
- 95°C por 10 min (inactivación de UDG y activación de la ADN polimerasa)
- Luego 50 ciclos de:
 - 95°C por 15 segundos (desnaturalización)
 - 60°C por 1 min (hibridación)

Las amplificaciones de cada muestra de ADNc se corrieron por triplicado, en placas de reacción de 96 pocillos en el equipo Light Cycler 480 (Roche).

Los experimentos de RT-qPCR incluyen un gen de referencia o control para poder normalizar los resultados. Típicamente, el gen normalizador es un gen endógeno que se expresa de forma constitutiva y constante. En este trabajo, se utilizó el gen HPRT (RN01527840_M1).

Las sondas TaqMan utilizadas fueron seleccionadas de la base de datos del proveedor Applied Biosystems. Para la cuantificación de la expresión génica en tejido hepático de la descendencia se midieron los genes GCK (RN00561265_M1), SOCS3 (RN00585674_S1), y FASn (RN00569117_M1) para medir el metabolismo de la glucosa, la resistencia a la insulina y la síntesis de ácidos grasos, respectivamente.

6.4.6 Análisis de los resultados de la expresión génica

El análisis de expresión génica se realizó en base al valor del ciclo umbral (Ct) registrado en el Light Cycler 480 Software Roche. Ya que no se obtuvo una óptima eficiencia del gen GCK, se utilizó el método Pfaffl el cual permite determinar valores de expresión génica relativa tomando en cuenta la curva de eficiencia de cada gen (Pfaffl, 2001).

En la ecuación 2, la letra E significa los resultados de la eficiencia, tanto del gen tratado y referencia. La relación de expresión relativa de un gen diana se calcula basándose en sus eficiencias (E) de PCR en tiempo real y la diferencia (Δ) de punto de cruce (Ct) de una muestra desconocida (tratamiento) a comparación de la muestra referencia. Con los valores de la eficiencia y Ct, se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{tratamiento}})^{\Delta Ct_{\text{tratamiento}} (referencia - tratamiento)}}{(E_{\text{referencia}})^{\Delta Ct_{\text{referencia}} (referencia - tratamiento)}}$$

Ecuación 2. Método Pfaffl. Modelo matemático para la cuantificación de la expresión relativa en PCR tiempo real.

VII. PLAN DE ANÁLISIS

Los resultados se expresan como \pm desviación estándar de la media (DEM). El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa estadístico SPSS versión 22.0. La significación estadística de las diferencias entre los grupos se evaluó mediante la prueba ANOVA seguida de la prueba post-hoc de Dunnett. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

VIII. RECURSOS

El proyecto se desarrolló en la Unidad de Genómica en el Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS), y se hizo uso de lo siguiente:

Equipos

- Campana de flujo laminar.
- Centrifugadora.
- Espectrofotómetro (Thermo Scientific NanoDrop 8000).
- Cámara de electroforesis.
- Termociclador (LightCycler 480, Roche).

Materiales

- Tejido hepático de ratas Wistar.
- Compuestos bioactivos naringenina-7-O-rutinósido y kaempferol 3-O-glucósido (Sigma-Aldrich).
- RNeasy Mini Kit (Qiagen).
- GoScript™ Reverse Transcription System (Promega).
- Taqman® Gene Expression Assays (Applied Biosystems).

8.1 Financieros

Proyecto financiado por CONACyT No. 783151 y PRODEP No. 255317.

8.2 Humanos

Participaron investigadores de la Unidad de Genómica del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS), así como asistentes y técnicos de laboratorio IBT. Bianka Dianey Camacho Zamora y M.C. Lizeth Alejandra Martínez Jacobo.

IX. CONSIDERACIONES ÉTICAS Y DE BIOSEGURIDAD

El presente proyecto de investigación se apegó a las condiciones y lineamientos de trabajo a llevar a cabo en un laboratorio establecidas por el Comité Institucional de Bioseguridad del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud y por el Comité de Bioética en Investigación en Ciencias de la Salud de la U.A.N.L (COBICIS).

Estos comités se apegan a las disposiciones emitidas por organismos nacionales e internacionales en materia de investigación y establecen pautas a seguir para el adecuado manejo de material biológico como cultivos celulares, dentro de estos lineamientos destacan:

- Se deberá contar con la indumentaria apropiada como bata y guantes, los cuales serán portados en todo momento.
- Se deberán mantener abastecidos frascos aspersores con soluciones de descontaminación.
- Se deberá contar con un estuche de desechos biológicos específicos para las líneas celulares.
- Al inicio y término de la jornada laboral se deberán limpiar las áreas de trabajo correspondientes al cuarto de cultivo.
- Únicamente pueden ser utilizadas pipetas, micropipetas, puntillas, frascos de cultivo o cualquier otro material destinado a cultivo celular que haya sido previamente esterilizado.
- Cualquier material utilizado para la manipulación del cultivo celular deberá ser desechado en el bote de residuos biológicos.

X. RESULTADOS

10.1 Ratas Wistar hembras

Efecto de la suplementación dietética sobre parámetros antropométricos y bioquímicos.

Con el fin de analizar los efectos de la dieta obesogénica en las ratas madres antes de la gestación, se registró su peso 3 veces a la semana y el peso final antes de ser apareadas.

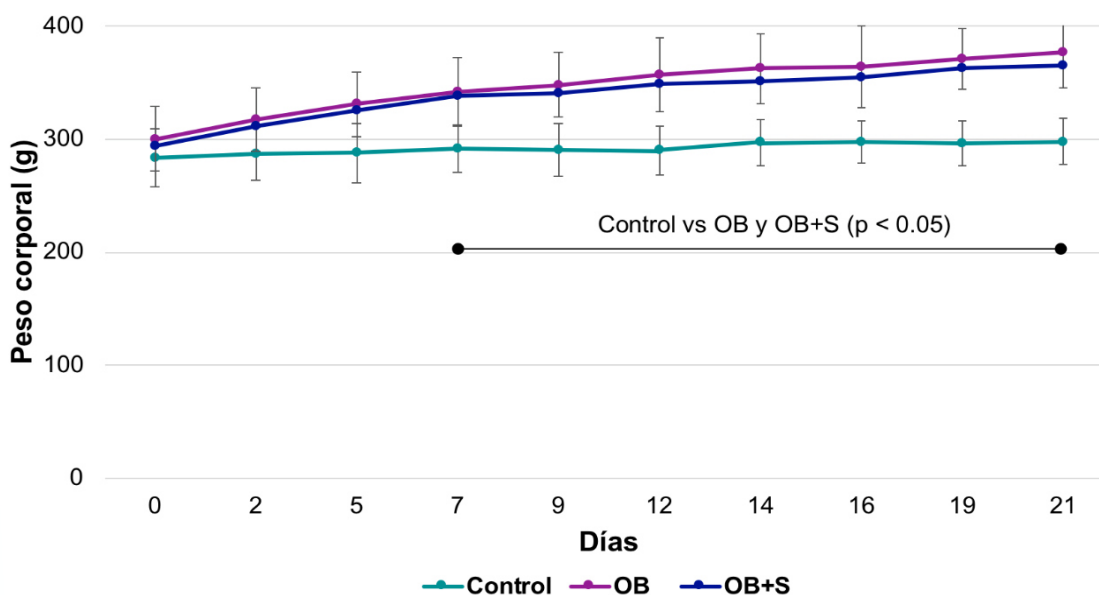


Figura 10. Ganancia de peso ratas Wistar hembras. Los resultados son expresados en medias \pm DEM. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA para analizar las diferencias de la media entre grupos y test Dunnett como prueba post hoc.

La figura 10 muestra la ganancia de peso de las ratas Wistar hembras durante 21 días experimentales. Desde el séptimo día se observó una diferencia significativa en el peso corporal de las ratas, entre el grupo Control y los grupos tratados con dieta obesogénica. Por otro lado, se percibe una tendencia en la disminución del peso del grupo obesogénico con suplementación (OB+S) a comparación con el grupo que solo se le suministró dieta obesogénica (OB).

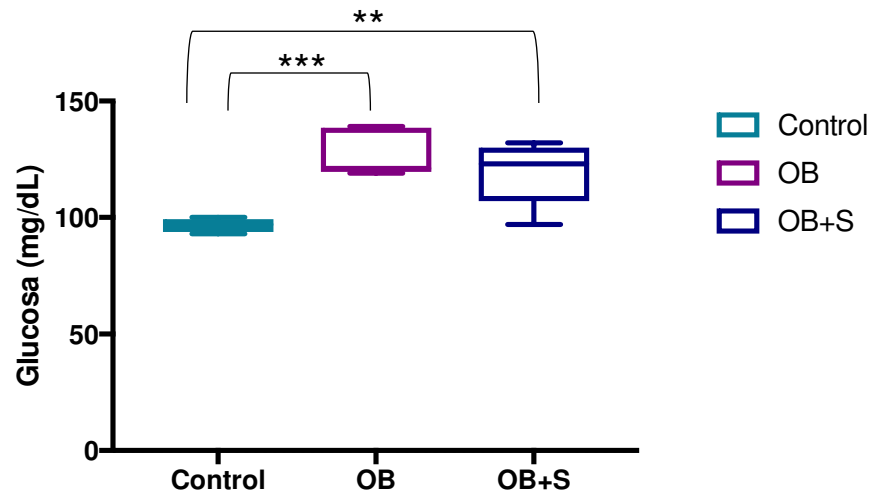


Figura 11. Niveles promedio de glucosa, los datos fueron tomados el día del sacrificio de las ratas Wistar hembras. Resultados expresados en medias \pm DEM. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA para analizar las diferencias de la media entre grupos y test de Dunnett como prueba post hoc. ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$).

La figura 11 muestra el análisis de los niveles de glucosa en sangre de las ratas Wistar hembras de los grupos Control, OB y OB+S. Se observó un aumento significativo entre el grupo OB ($p < 0.001$) y OB+S ($p < 0.01$) a comparación con el grupo Control.

10.2 Ratas Wistar macho crías

Efecto de la suplementación dietética durante la etapa perinatal, sobre parámetros antropométricos, bioquímicos y genéticos.

En la tabla 7 se muestran los parámetros obtenidos a lo largo del periodo experimental entre las crías que pertenecen a las madres del grupo Control, grupo OB y grupo OB+S. A diferencia de las ratas Wistar hembras, el registro de peso de las crías se realizó una vez a la semana.

Tabla 7

Peso corporal total (g) por semana de ratas Wistar macho crías alimentados con dieta control.

Semana	Control (n=12)	OB (n=9)	OB+S (n=9)
0	6.84 ± 0.40 +++	5.86 ± 0.26	6.02 ± 0.48
1	12.88 ± 1.34	15.51 ± 2.13	14.90 ± 3.97
2	24.46 ± 2.72 ++	32.01 ± 3.24	30.41 ± 6.39
3	33.03 ± 3.49	34.04 ± 2.31	45.57 ± 8.08 ***
4	77.15 ± 0.49 ++	61.46 ± 3.57	92.44 ± 14.48 ***
5	125.90 ± 11.31 +	108.61 ± 4.47	141.56 ± 23.31 ***
6	172.08 ± 17.10	156.96 ± 6.95	186.56 ± 24.81 **
7	219.98 ± 17.98	203.11 ± 9.12	235.69 ± 30.24 **
8	260.00 ± 23.54	249.25 ± 9.85	281.56 ± 35.64 *
9	292.00 ± 32.04	288.11 ± 10.49	305.78 ± 32.68
10	313.17 ± 28.72 +	350.11 ± 15.78	344.22 ± 44.53
11	328.50 ± 29.64 +	365.11 ± 18.56	361.00 ± 46.07
12	332.58 ± 30.70 ++	384.11 ± 20.84	365.56 ± 46.72
13	343.75 ± 24.12 ++	400.67 ± 17.94	376.11 ± 46.75
14	366.42 ± 28.20 ++	431.22 ± 23.58	399.11 ± 52.53
15	373.58 ± 32.65 +++	444.33 ± 24.19	406.22 ± 49.36 ~
16	371.50 ± 33.57 +++	453.33 ± 26.65	407.44 ± 49.36 *

*Los resultados son expresados en medias ± DEM. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA para analizar las diferencias de la media entre grupos y test de Dunnett como prueba post hoc. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (OB vs OB+S); + p<0.05, ++ p<0.01, +++ p<0.001 (Control vs OB), ~ t<0.1 (OB vs OB+S). Peso registrado en gramos.*

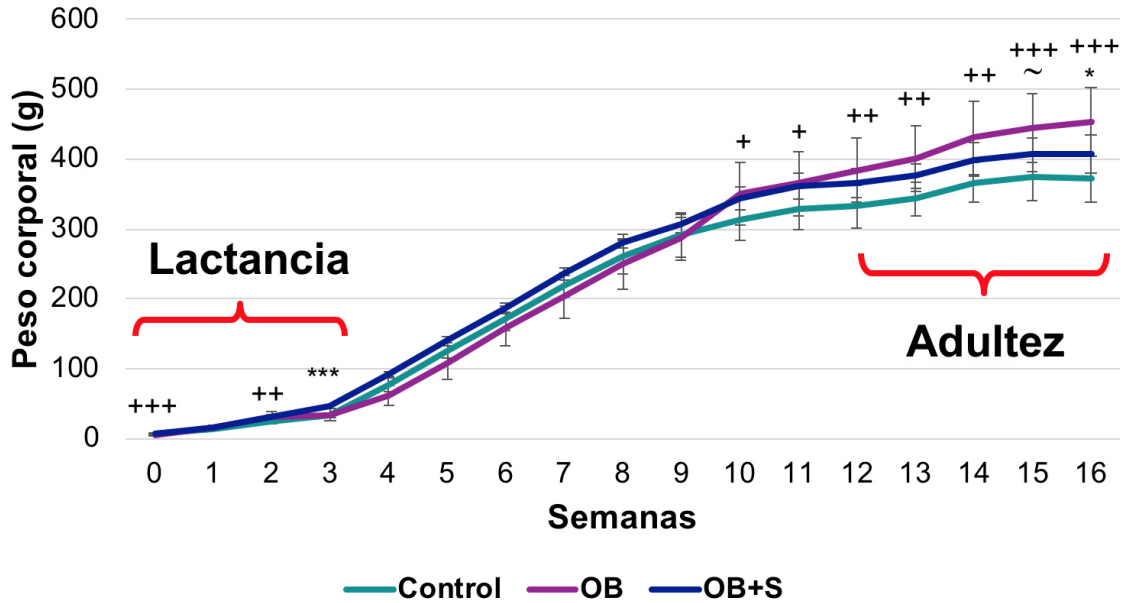


Figura 12. Los resultados son expresados en medias \pm DEM. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA para evaluar las diferencias de la media entre los grupos y test de Dunnett como prueba post hoc. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (OB vs OB+S); + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$ (Control vs OB+S, $\sim t < 0.1$ (OB vs OB+S).

La figura 12 presenta la ganancia de peso por grupo observando, desde el nacimiento, un peso menor en las crías pertenecientes al grupo de madres alimentadas con dieta OB en comparación con el grupo OB+S sin encontrarse diferencia significativa. Ambos grupos tuvieron menor peso al nacer que el grupo Control, siendo estadísticamente significativo ($p < 0.05$) entre grupo Control y OB. De la semana 3 a 8 de vida se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los grupos OB y OB+S, siendo este último el de mayor peso. A partir de la semana 15 se encontró una tendencia ($t < 0.1$) y un valor significativo en la semana 16, resultando el grupo OB con mayor peso a comparación con el grupo OB+S. Se comparó el grupo control y OB para buscar diferencias entre ambos, el grupo OB alcanzó un peso menor significativo ($p < 0.05$) al nacer. Sin embargo, el grupo Control mostró una diferencia significativa con un peso menor de la semana 10 a la 16. Por último, se calculó la ganancia de peso total de las ratas Wistar macho crías al finalizar el experimento (semana 16)

observando ganancia de peso mayor en el grupo OB a comparación con el grupo control y OB+S (Tabla 8).

Tabla 8

Parámetros antropométricos obtenidos en ratas Wistar macho crías alimentadas con dieta control de hembras alimentadas con dieta Control, OB y OB+S en la etapa perinatal.

Parámetros antropométricos	Grupo		
	Control (n=12)	OB (n=9)	OB+S (n=9)
Ganancia de peso corporal promedio (g)	364.66 ± 33.58 ++	447.48 ± 26.44	401.42 ± 49.07 *
Peso corporal final promedio (g)	371.50 ± 33.57 ++	453.33 ± 26.65	407.44 ± 49.36 *
Peso de tejido adiposo mesentérico (g/100 g PC)	0.42 ± 0.06	0.42 ± 0.06	0.40 ± 0.05
Peso de hígado (g/100 g PC)	2.95 ± 0.09	2.91 ± 0.27	2.65 ± 0.09 **

Los resultados son expresados en medias ± DEM. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA para analizar las diferencias de la media entre grupos y test de Dunnett como prueba post hoc. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (OB vs OB+S); +++ $p < 0.001$ (Control vs OB).

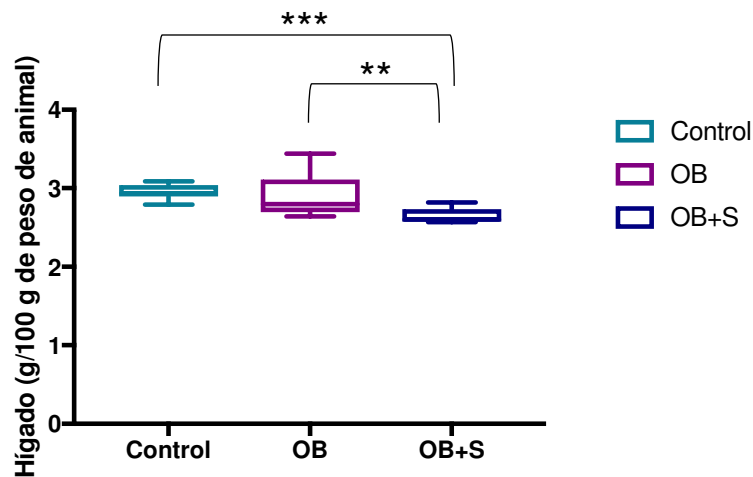


Figura 13. Peso de hígado de ratas Wistar macho crías. Resultados expresados en medias ± DEM. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA para analizar las diferencias de la media entre grupos y test de Dunnett como prueba post hoc. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

La figura 13 muestra el peso del hígado de las ratas crías macho de los grupos Control, OB y OB+S. Se observó una disminución significativa entre el grupo OB+S y OB ($p < 0.01$) y OB+S y Control ($p < 0.001$).

Tabla 9

Parámetros bioquímicos en suero de ratas Wistar macho crías alimentadas con dieta control de madres alimentadas con dieta Control, OB y OB+S en etapa perinatal.

Parámetros bioquímicos	Grupo		
	Control (n=12)	OB (n=9)	OB+S (n=9)
Glucosa (mg/dL)	95.91 ± 8.37	100.33 ± 4.21	100.78 ± 10.99
Insulina (ng/mL)	0.44 ± 0.13 ++	2.32 ± 1.46	0.71 ± 0.26 **
HOMA-IR	2.63 ± 0.79 ++	14.31 ± 8.73	4.55 ± 1.94 **
Leptina (ng/L)	2.6 ± 2.21	4.2 ± 2.54	1.52 ± 1.04 *

Los resultados son expresados en medias ± DEM. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA para evaluar las diferencias de la media entre grupos y test de Dunnett como prueba post hoc. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (OB vs OB+S); ++ $p < 0.01$, (Control vs OB).

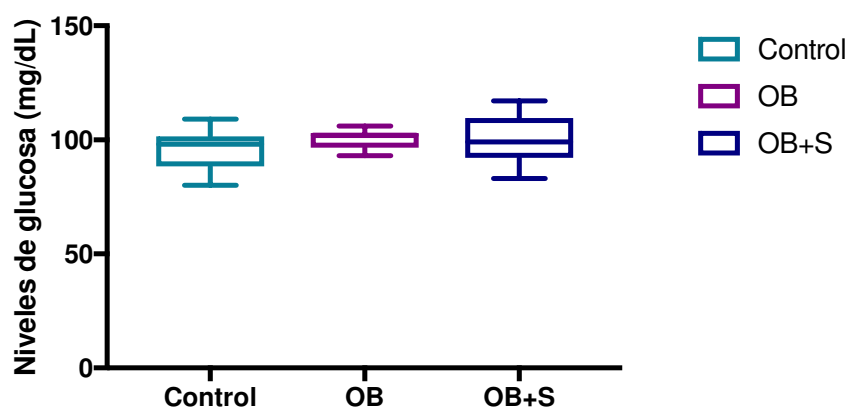


Figura 14. Niveles promedio de glucosa, los datos fueron tomados el día del sacrificio de ratas Wistar macho crías. Resultados expresados en medias ± DEM. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA para analizar las diferencias de la media entre grupos y test de Dunnett como prueba post hoc.

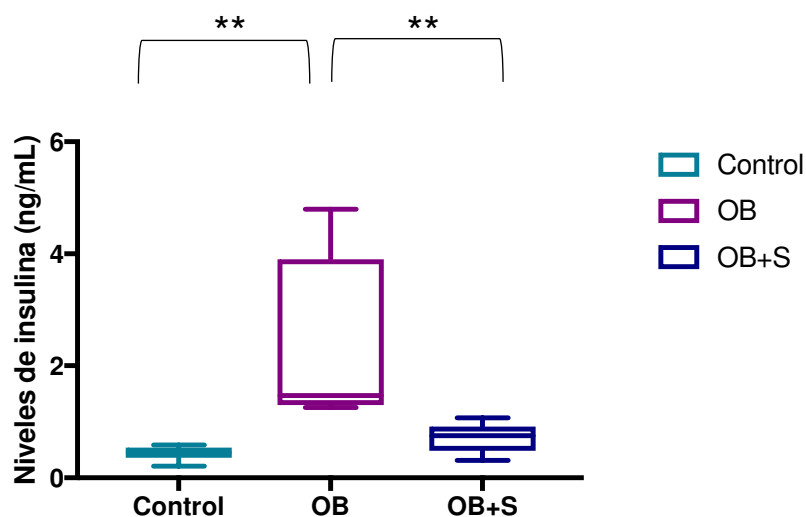


Figura 15. Niveles promedio de insulina en ratas Wistar macho crías. Resultados expresados en medias ± DEM. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA para analizar las diferencias de la media entre grupos y test de Dunnett como prueba post hoc. ** $p < 0.01$.

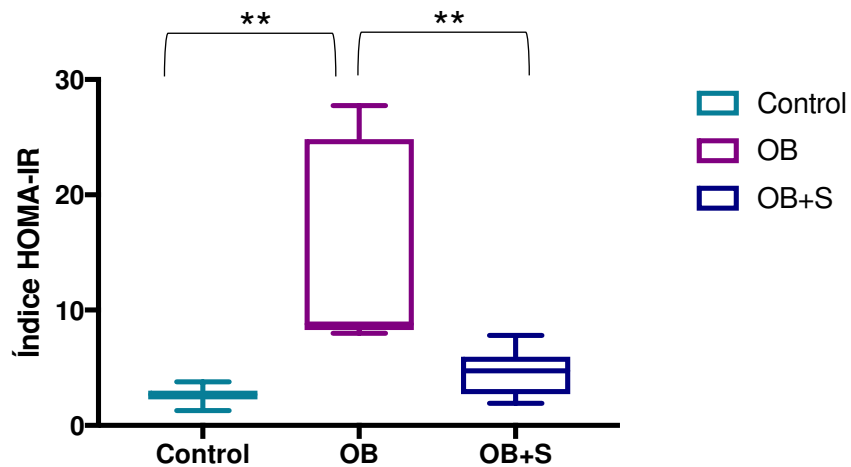


Figura 16. Índice HOMA-IR. Resultados expresados en medias \pm DEM. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA para analizar las diferencias de la media entre grupos y test de Dunnett como prueba post hoc. ** $p < 0.01$.

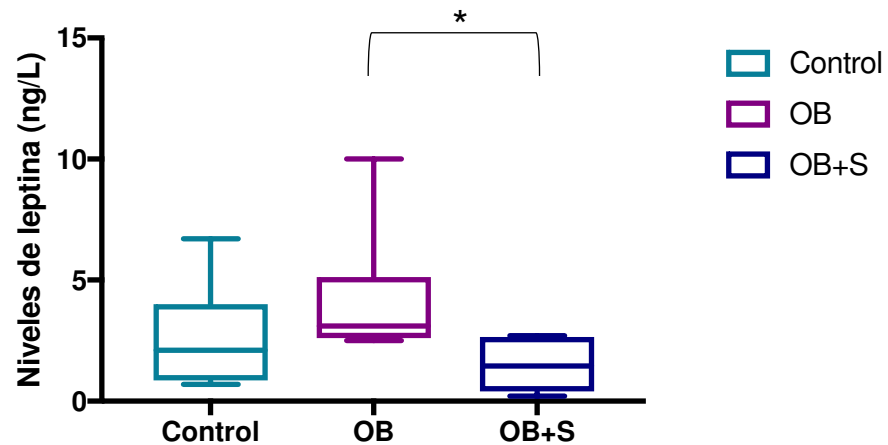


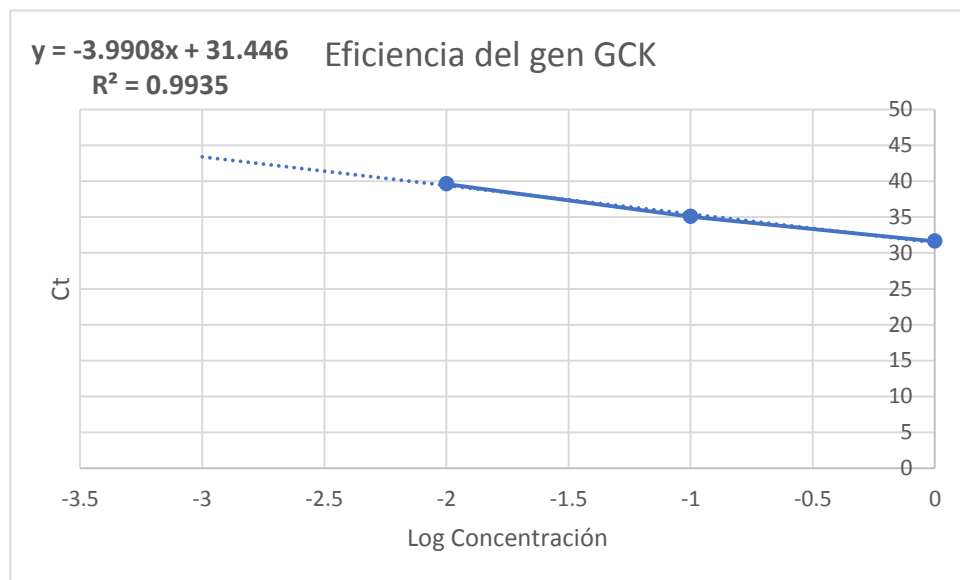
Figure 17. Niveles promedio de leptina en ratas Wistar macho crías, los datos fueron tomados el día del sacrificio y almacenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su análisis. Resultados expresados en medias \pm DEM. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA para analizar las diferencias de la media entre grupos y test de Dunnett como prueba post hoc. * $p < 0.05$.

La tabla 9 muestra los resultados del análisis bioquímico de los grupos Control, OB y OB+S de ratas Wistar macho crías alimentados con dieta control. En cuanto a los niveles de glucosa en sangre en ayunas (Figura 14) no se

encontraron resultados significativos entre los grupos de estudio. Se analizó por medio de la técnica ELISA los niveles séricos de insulina y leptina encontrando diferencias significativas en insulina entre los grupos Control y OB. Además, se observó una diferencia significativa entre el grupo OB y OB+S, siendo OB el grupo con mayores niveles de insulina sérica (Figura 15). Se midió el índice HOMA-IR y se observó una disminución significativa entre los grupos Control y OB+S (ambos $p < 0.01$) a comparación del grupo OB (Figura 16). Por último, se encontró diferencias significativas en los niveles promedio de leptina entre los grupos OB y OB+S (Figura 17).

Finalizando el periodo experimental, se tomó el hígado de las ratas Wistar macho crías para llevar a cabo el análisis de expresión génica mediante RT-qPCR empleando sondas TaqMan específicas para los genes GCK, FASN, SOCS3 y HPRT1 (gen control). Previo a los ensayos de cuantificación de expresión génica, se determinó la eficiencia de amplificación de cada una de las sondas. Los resultados de estos ensayos demostraron una amplificación entre 94-98%, excepto la amplificación del gen GCK (Figura 18 y Tabla 10).

A



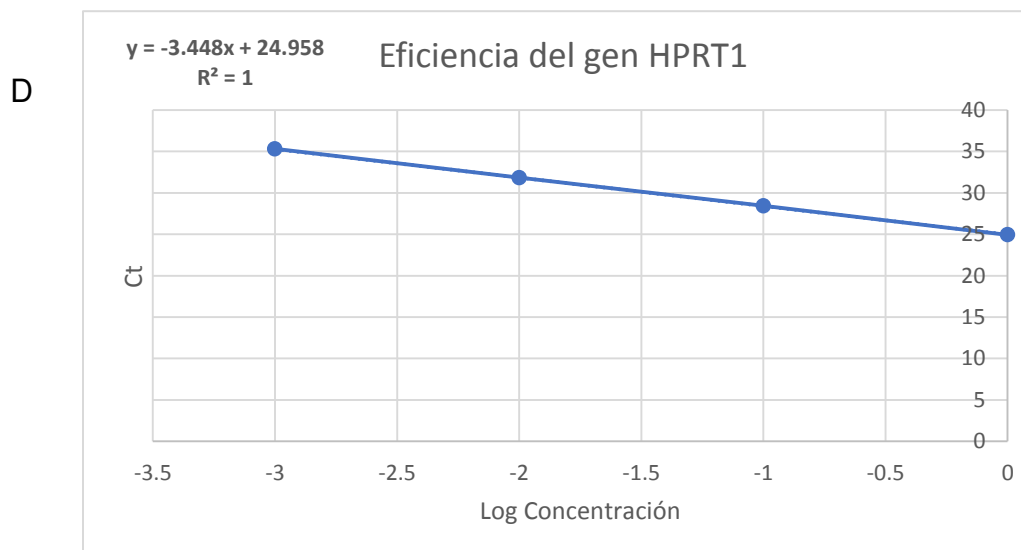
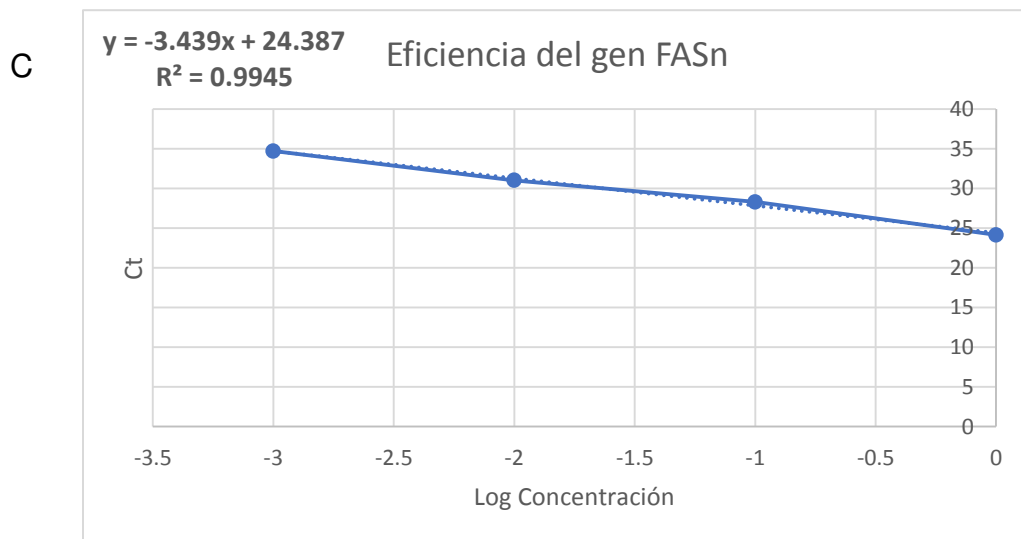
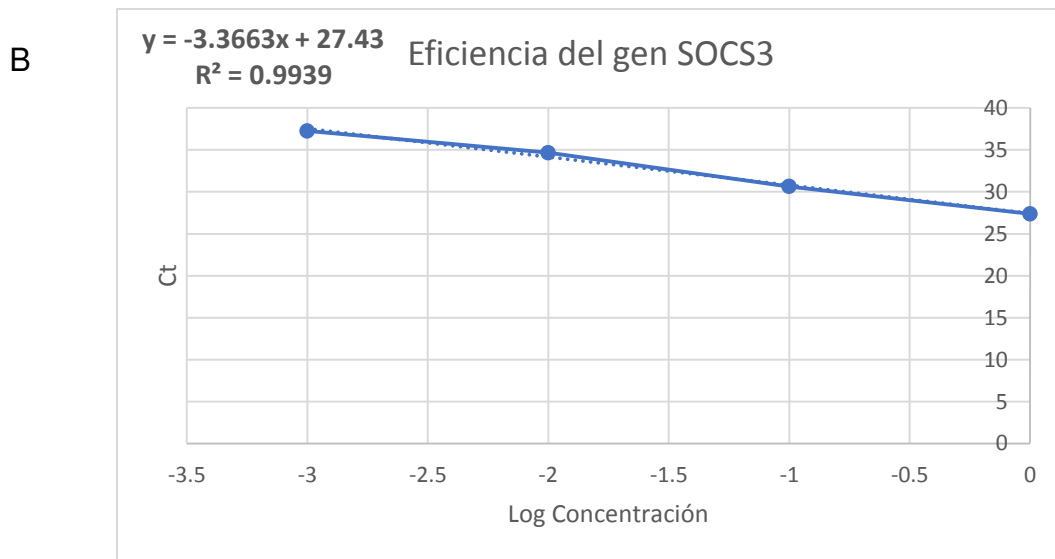


Figura 18. Curvas de calibración para los genes GCK, FASn, SOCS3 y HPRT1.

Tabla 10

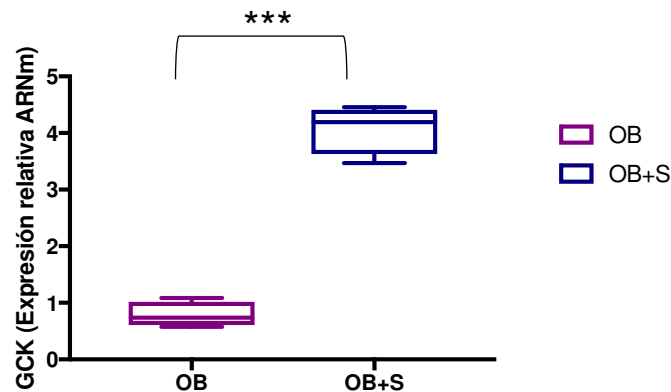
Eficiencias de amplificación de los genes.

Gen	Eficiencia
GCK	78%
FASn	95%
SOCS3	98%
HPRT1	94%

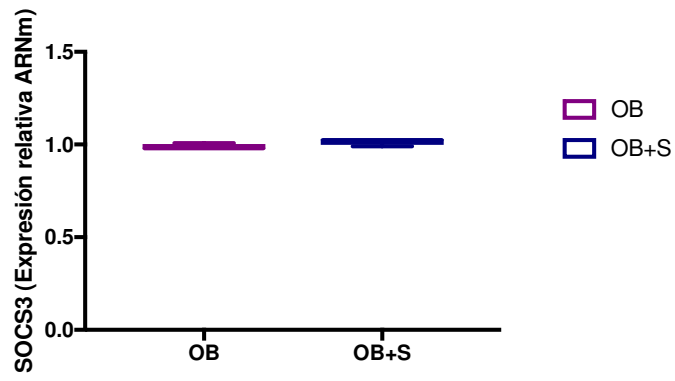
Para el cálculo de la expresión génica relativa (RQ) se utilizó el método Pfaffl. A diferencia del método delta-delta Ct que supone que las eficiencias de los cebadores son similares (generalmente entre 90 - 110%) entre el gen de interés y el gen control, el método Pfaffl considera las diferencias de eficiencia para aumentar la reproducibilidad.

En el presente estudio se encontró una diferencia significativa de los genes *GCK* ($p < 0.001$) relacionado al metabolismo de la glucosa (Figura 19A) entre los grupos OB y OB+S. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa en el gen *FASn* y *SOCS3*, relacionado a la síntesis de ácidos grasos (Figura 19B) y resistencia a la insulina (Figura 19C), respectivamente.

A



B



C

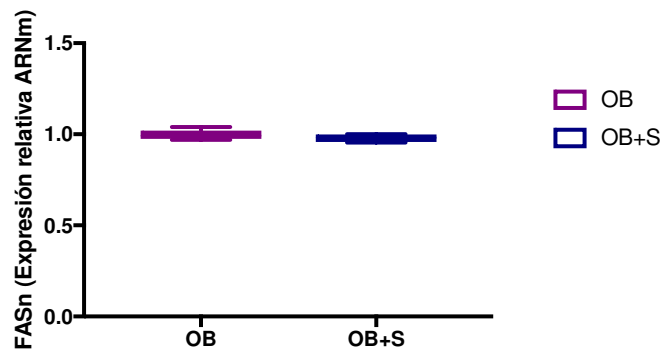


Figura 19. Expresión relativa de genes GCK, FASn y SOCS3 normalizado con control valor a 1. El nivel de expresión relativa se calculó mediante el método Pfaffl. El análisis estadístico se realizó mediante prueba T, resultados expresados en medias \pm DEM. *** $p < 0.001$

XI. DISCUSIÓN

11.1 La dieta de cafetería induce obesidad y aumenta los niveles de glucosa en sangre en ratas Wistar madres

La mayor prevalencia de casos de sobrepeso y obesidad en todo el mundo se ha producido por el desbalance entre la disminución progresiva de la energía gastada en actividad física combinado con el incremento en la ingesta de alimentos altamente calóricos, lo que induce un aumento de peso descontrolado (Kleinert et al., 2018). En el entorno de la investigación, el estudio de los mecanismos por los cuales la obesidad induce daño a la salud se puede facilitar mediante el uso de modelos animales que asemejen el estado obesogénico del ser humano. Existen varios tipos de modelos animales, generalmente roedores, que desarrollan obesidad debido a dietas con modificaciones en la proporción de los macronutrientes (Warden & Fisler, 2008).

La ingesta de grasa en la dieta a menudo se ha atribuido al aumento de la adiposidad. Estudios en humanos han demostrado que las dietas ricas en grasas (30% de energía de la grasa) pueden inducir fácilmente la obesidad (Hariri & Thibault, 2010). Así mismo, se ha encontrado una relación positiva entre el nivel de grasa en la dieta y el peso corporal o ganancia de grasa de ratas o ratones (Coppola & Moshé, 2012).

En la literatura científica, se demostró por primera vez que las ratas que consumen dietas que contienen altas proporciones de grasa ganaban peso más rápido a diferencia de aquellas con dietas que contienen cantidades mínimas de grasa. En 1949, la obesidad fue inducida por primera vez en ratas mediante la alimentación a libre demanda de una dieta semi-líquida alta en

grasa (INGLE, 1949). Luego, en 1953, Fenton & Dowling utilizó dietas ricas en grasa con 50% de la energía total en ratones destetados para inducir la obesidad; lo llamaron obesidad nutricional, pero el modelo fue nombrado de nuevo más tarde como obesidad dietética (Fenton & Dowling, 1953).

Por lo general, dietas altas en grasa, del 30-78% de la ingesta total de energía, son utilizadas para el estudio de la obesidad en ratas y ratones, ya sea añadiendo una grasa particular a la dieta del animal o usando una variedad de alimentos ricos en grasa y azúcar (dieta de cafetería) (Higa, Spinola, Fonseca-Alaniz, & Anna Evangelista, 2014). El uso de dietas altas en hidratos de carbono y bajas en grasa no se ha encontrado tan eficiente como las dietas altas en grasas y bajas en hidratos de carbono para inducir la obesidad, sin embargo, en el artículo de Boqué et al., 2009 demostraron lo contrario. En éste, utilizaron cuatro tipos de dietas experimentales, control, alta en grasa (60% de grasa), alta en grasa y sacarosa (45% de grasa y 17% de sacarosa) y alta en sacarosa (42% de sacarosa). En 35 días todos los grupos menos el control aumentaron significativamente de peso y grasa corporal, observando que las ratas con dieta alta en sacarosa tuvo deterioros metabólicos más pronunciados.

En el estudio de Sampey et al., 2011 se utilizaron ratas Wistar macho para comparar diferentes dietas que inducen la obesidad en los cambios del peso corporal. Antes del inicio del estudio no hubo diferencias en la ingesta de alimentos o el peso corporal entre animales asignados a grupos de dieta experimental. Para el estudio se dividieron las ratas en cuatro grupos experimentales, primer grupo con dieta estándar, segundo con dieta baja en grasa, tercero con dieta alta en grasa y cuarto con dieta de cafetería. Esta última dieta consistía en alimento estándar para rata más un surtido diario de tres productos de aperitivo humano (ej. galletas, chocolates, cereales, quesos, entre otros). El porcentaje de grasa en estas dietas difería siendo la de cafetería la dieta con más contenido de grasa (45-53%). Se comprobó que, en la

segunda semana de experimentación, hubo un aumento significativo del peso de las ratas alimentadas con dieta de cafetería a comparación de las ratas con dieta estándar. Después de una exposición prolongada (15 semanas) a la dieta de cafetería, la hiperglucemia se hizo evidente solo en ratas alimentadas con dieta de cafetería, ya que 3 de 10 exhibieron hiperglucemia después de un intervalo de 6 horas antes del sacrificio sin diferencias entre los demás grupos.

Por otro lado, se ha descrito que una dieta con un elevado porcentaje de lípidos administrada a ratones durante la gestación produce un incremento en la descendencia de la longitud corporal, así como un descenso en la sensibilidad a la insulina (Maloney et al., 2011; Ng et al., 2010). Por otro lado, cuando la “ventana” de administración de la dieta hiperlipídica en ratones se amplía a la gestación y la lactancia, la descendencia incrementa su predisposición a padecer síndrome metabólico (Yajnik and Deshmukh 2008; Ng et al., 2010). Es por esto que la etapa prenatal y postnatal temprana han demostrado tener un rol crítico en el desarrollo de obesidad, incrementando la evidencia de procesos epigenéticos como centro del mecanismo en el que el ambiente de la alimentación temprana aumenta la susceptibilidad de obesidad en la edad adulta (Lillicrop & Burdge, 2010). Se ha observado cómo el ambiente de desarrollo puede sugerir modificaciones epigenéticas de manera significativa, de modo que se predispone a la descendencia a enfermedades metabólicas, como obesidad y diabetes (Kasinska, Drzewoski & Sliwinska, 2016).

Así, intervenciones nutricionales que mejoren el medio ambiente en el útero para una mejor programación fetal podrían tener un impacto en la prevención del desarrollo de la obesidad y enfermedades metabólicas relacionadas. El estudio de diferentes extractos naturales y compuestos bioactivos que se aíslan por diferentes métodos desde diversas partes de plantas y alimentos está siendo de gran interés (de la Garza et al., 2011;

Etxeberria et al., 2012; Panickar 2013). Así, la finalidad del presente trabajo se ha orientado al estudio de la suplementación dietética con flavonoides durante la etapa perinatal para la prevención de la obesidad y sus comorbilidades originada por un modelo dietético obesogénico.

En este contexto, el primer objetivo de nuestra investigación fue la inducción de obesidad en ratas Wistar hembras y la suplementación dietética con flavonoides durante la etapa perinatal. Para medir este objetivo se clasificaron las ratas en tres grupos; el grupo control alimentado con dieta estándar (335 kcal/100 g), el grupo obesogénico alimentado con dieta de cafetería (372 kcal/100 g), y el grupo obesogénico suplementado con 15 mg/kg de peso de kaempferol-3-O-glucósido y 30 mg/kg de peso de narirutina. En relación a los resultados, en el séptimo día del experimento se observó una diferencia significativa entre los pesos corporales de las ratas alimentadas con dieta obesogénica y control. En cuanto a los niveles de glucosa en sangre, se observó un aumento significativo entre los grupos OB y OB+S en comparación con el grupo control.

En un estudio realizado por Crew, Waddell, & Mark, 2016 utilizaron 14 ratas Wistar hembras para investigar la obesidad materna inducida por una dieta de cafetería. Después de una semana de aclimatación, los animales tuvieron acceso *ad libitum* a una dieta control (n=7) para roedores (12% grasa, 23% proteína y 65% hidratos de carbono) o una dieta de cafetería (n=7) que consistía en bocadillos humanos (ej. pastel de queso, salchicha, galletas, entre otros) además de su alimentación estándar. Los animales en el grupo de dieta de cafetería recibieron una selección de cuatro bocadillos por día. La dieta de cafetería proporcionó una energía total promedio de 41% de grasa, 12% de proteína y 47% de hidratos de carbono. La ingesta de este tipo de dieta se mantuvo durante todo el experimento (antes, durante y después de la

gestación). La ingesta de alimentos y el peso corporal se midieron diariamente. El grupo de cafetería mostró un aumento del 48% en la ingesta calórica durante la primera semana de exposición a la dieta y lo mantuvo durante todo el periodo de alimentación antes de la etapa gestacional. De acuerdo con este aumento en el consumo calórico, los animales del grupo con dieta de cafetería obtuvieron un 40% más de peso pre-gestacional total que los animales con el grupo con dieta estándar. La separación de las trayectorias del peso se hizo evidente 2 semanas después del inicio de la dieta experimental y después de 8 semanas, los animales del grupo cafetería presentaron un 25% más de peso corporal. Sin embargo, no hubo diferencia significativa en los niveles de glucosa en ratas madre del grupo de cafetería ni en su descendencia.

En otro estudio transgeneracional, Zou et al., 2017 evaluó la suplementación dietética materna con resveratrol (aproximadamente 200 mg/kg de peso corporal) durante la gestación y lactancia en la descendencia macho. Las ratas hembras fueron categorizadas en cuatro grupos: control, control más resveratrol, alto en grasa (45% de grasa) y alto en grasa más resveratrol. Aunque la administración con resveratrol no modificó el consumo de energía durante el embarazo y lactancia, el grupo de ratas hembras con dieta alta en grasa tuvo un peso corporal mayor que las ratas control y control suplementadas con resveratrol. Además, no se observaron diferencias en las concentraciones de glucosa sérica materna. A diferencia del estudio de Zou, en nuestro estudio el grupo de las ratas hembras alimentadas con dieta alta en grasa tuvo un aumento significativo en los niveles de glucosa sérica pre-gestacional.

Algunos informes han atribuido la obesidad inducida por las dietas ricas en grasas a su alta eficiencia (aumento de peso corporal por kcal de alimento consumido). La termogénesis inducida por la dieta es la energía para digerir, absorber y almacenar nutrientes y produce una pérdida de energía para el

cuerpo que es del 2-3% para las grasas, del 25-30% para las proteínas y del 6-8% para los hidratos de carbono. Por lo que la energía de la grasa tiene un mayor efecto sobre la ganancia de peso corporal que la energía de fuentes no grasas (Westerterp-Plantega, 2004).

La facilitación de la ingesta por las características sensoriales de los alimentos ricos en grasa es una influencia importante en la ingestión. La estimulación sensorial del consumo de alimentos puede influir directamente en la ingesta de energía promoviendo la selección, el consumo, la digestión y la absorción de un alimento (Sclafani, 2001). También aumenta la termogénesis inducida por la dieta. Los alimentos con alto contenido de grasa generalmente son preferidos por las ratas a los que son bajos en grasa y, como resultado, se consume en mayores cantidades. Una variedad de propiedades sensoriales contribuye a esta alta palatabilidad de las dietas ricas en grasa, principalmente textura y olor (Yeomans, Blundell, & Leshem, 2004).

Por otro lado, diferentes estudios como el de Zang, Zhang, Igarashi, & Yu, 2015 y de la Garza et al., 2015 analizaron la suplementación con kaempferol y naringenina y el posible efecto preventivo en el desarrollo de la obesidad en ratas alimentadas con dieta alta en grasa.

En el caso del flavonoide kaempferol, Zang, Zhang, Igarashi, & Yu, 2015, evaluaron la suplementación con dicho flavonoide en ratas macho por 92 días. Se dividieron en tres grupos: control, dieta alta en grasa (30% de grasa) y dieta alta en grasa con kaempferol (0.15%). Los resultados del peso corporal de las ratas alimentadas con dieta alta en grasa suplementadas con kaempferol fue significativamente mas bajo que las ratas alimentadas solamente con dieta alta en grasa. Se observó en el día 42 una disminución significativa en la

glucosa sérica en ayunas en ratas suplementadas con kaempferol en comparación con las ratas alimentadas con dieta alta en grasa.

Por otro lado, en el estudio de de la Garza et al., 2015, se evaluó la suplementación con extractos de helicriso (2 g/kg de peso corporal) y toronja (1 g/kg de peso corporal) en ratas alimentadas previamente con una dieta alta en grasa (45% de grasa). Se categorizaron las ratas en dos grupos: control y dieta alta en grasa y fueron alimentadas por 22 días. Después de las tres semanas, las ratas con la dieta alta en grasa ganaron más peso corporal y mostraron una hiperglucemia a comparación del grupo control. Una vez inducida la obesidad por medio de la dieta, se categorizaron en tres grupos: no suplementados, suplementados con extracto de helicriso y suplementados con extracto de toronja por cinco semanas. Se conoce que el helicriso y la toronja contienen altas cantidades de flavonoides kaempferol-3-*O*-glucósido y naringenina, respectivamente; por lo que los autores concluyen que una posible razón por la que las ratas suplementadas tuvieron un efecto positivo en la disminución del peso corporal se puede deber a un mecanismo preventivo en el desarrollo de la obesidad por parte de los flavonoides.

Debido al rápido aumento de la prevalencia de obesidad se ha puesto en cuestión el papel que podría desempeñar el entorno en el que nuestros más cercanos antepasados han vivido y que éste pueda representar un factor importante a considerar en el desarrollo de la obesidad. En relación a esto, se han descubierto compuestos bioactivos que ejercen una función preventiva en el desarrollo de esta epidemia (Chambers, Morgan, Heger, Sharpe, & Drake, 2016). Sin embargo, es importante destacar que en nuestro estudio no se observó una reducción en el peso corporal ni en los niveles de glucosa en el grupo suplementado con ambos flavonoides kaempferol-3-*O*-glucósido y naringenina. Las razones por la cual este efecto tiene diferentes resultados en

otros estudios se puede deber a factores como el tiempo de exposición a la suplementación, el tipo y cantidad de flavonoide, entre otros (Ribaroff et al., 2017). Claramente la heterogeneidad entre la metodología de estos estudios se ve reflejado en los resultados por lo que se necesita más estudios que ayuden a comprender los mecanismos de los flavonoides en la prevención de la obesidad.

11.2 La suplementación materna con narirutina y kaempferol-3-O-glucósido previene el aumento de peso en la edad adulta de la descendencia.

La obesidad materna y el consumo de dietas obesogénicas durante el embarazo y la lactancia han demostrado aumentar el riesgo de obesidad y comorbilidades asociadas en la descendencia (Leddy et al., 2008). Se cree que este efecto se debe a la exposición del feto/neonato a un mayor suministro de nutrientes durante períodos críticos de desarrollo, lo que resulta en alteraciones permanentes de la estructura, perfil de expresión génica y función de los órganos clave y sistemas reguladores responsables del control metabólico (Soares et al., 2018). Estos efectos tempranos del ambiente materno nutricional en el crecimiento y metabolismo de la descendencia y su impacto a largo plazo en la salud se definen como programación metabólica (Rkhzay-Jaf, O'Dowd, & Stocker, 2012). Como tal, la obesidad experimental puede producirse mediante manipulaciones dietéticas maternas o posteriores al destete (Vithayathil et al., 2018). En modelos experimentales con animales, la obesidad está relacionada con un perfil bioquímico anormal, con ratas obesas que presentan niveles elevados de triglicéridos en suero e intolerancia a la glucosa en su descendencia (Santos et al., 2017). Esta obesidad puede estar provocada por una distribución de macronutrientes promoviendo la hiperfagia voluntaria, aumento de peso corporal, expansión del tejido adiposo exacerbado,

hiperglucemia, hiperinsulinemia y procesos inflamatorios en el hígado y tejido adiposo (Hariri & Thibault, 2010).

En nuestro estudio, las ratas del grupo de ratas madres alimentadas con dieta obesogénica (OB) tuvo una disminución significativa del peso corporal en el nacimiento a comparación con el grupo control. Así mismo, en el estudio de Li et al., 2017, sus resultados mostraron que la descendencia masculina de las madres alimentadas con dieta obesogénica tuvo un peso al nacer disminuido. Sin embargo, estos resultados son controversiales ya que existen diversas investigaciones que demuestran lo contrario.

En ese sentido, Ribaroff G.A., et al., 2017 realizaron una revisión en relación a modelos animales sobre exposición materna a dieta rica en grasas y los efectos sobre el metabolismo en la descendencia. Así, encontraron que, después de analizar los resultados de 57 estudios en crías macho, la exposición dietética materna no tuvo un efecto global sobre el peso al nacer. Sin embargo, cuando se seleccionó la especie para dicho análisis, la exposición materna a dieta alta en grasas aumentó el peso al nacer en ratones machos. Por otro lado, se encontró una tendencia en un menor peso al nacer en ratas macho de madres alimentadas con dieta alta en grasa.

Por otro lado, la exposición materna a dieta alta en grasa, se asoció con un aumento del peso corporal al destete en la descendencia, sin embargo, en la descendencia masculina, una mayor proporción de hidratos de carbono en la dieta materna, se asoció con un aumento en el peso al destete, por lo que no se han identificado con claridad los posibles factores en la descendencia masculina (Ribaroff G.A., et al., 2017). Por ejemplo, un estudio realizado por Sun et al., 2012 en ratas Sprague-Dowley alimentadas con dieta alta en grasa durante la gestación y lactancia, encontraron que las crías de madres

alimentadas con dieta alta en grasa ganaron mayor peso corporal desde el día 7 post-natal en comparación de las crías de madres alimentadas con dieta control.

Por otro lado Chang, Gaysinskaya, Karatayev, & Leibowitz, 2008, examinaron los efectos de un periodo más corto de exposición a una dieta alta en grasa (dos semanas antes del nacimiento y postnatal). Además, en lugar de utilizar una dieta baja en grasa (10% de grasa) como control, se comparó la dieta alta en grasa (50% de grasa) con una dieta más equilibrada y con contenido moderado de grasa (25% de grasa) imitando de una mejor manera la dieta de un ser humano. Los resultados mostraron resultados similares al estudio realizado por Sun et al., 2012, donde los descendientes del grupo de la dieta alta en grasa exhibieron un aumento en el peso corporal y la ingesta calórica diaria a los 30 días de edad (9 días después del destete) y mostraron una preferencia por la grasa dietética cuando se proporcionó una elección de dos dietas.

En nuestro estudio, a diferencia del estudio de Sun y Chang, la exposición a la dieta obesogénica duró 10 semanas comenzando 3 semanas antes de la concepción y terminando después de las tres semanas de lactancia. Una razón puede ser lo que mencionan en el estudio de Palou & Picó, 2009 ya que observaron los efectos beneficiosos de la leptina en la leche materna a partir de estudios en humanos pareciendo dar una protección moderada a los bebés del aumento de peso excesivo. La evidencia directa de causa y efecto se obtuvo en ratas, donde la suplementación oral de leptina durante el período de lactancia produjo una disminución en el peso al nacer, igualmente afectando las preferencias alimentarias a favor de hidratos de carbono en vez de grasa protegiendo contra el sobrepeso en la adultez con una mejora de parámetros tales como leptina y sensibilidad a la insulina. Sin embargo, aunque es una

teoría interesante, no podemos llegar a esa conclusión ya que no contamos con los niveles de leptina en las ratas hembras madres.

La influencia de la dieta materna en la composición de la leche puede ser uno de varios factores en la generación de obesidad en la descendencia. Estudios han demostrado que la calidad de los lípidos de la dieta materna consumidos durante la lactancia se correlaciona con el perfil nutricional secretado de la leche (Bautista et al., 2016). De acuerdo con Purcell et al., 2011, en el décimo día, la leche de las ratas alimentadas con una dieta alta en grasas se vuelve más calórica y rica en grasas. Del mismo modo, estudiaron la composición de la leche de ratas alimentadas con una dieta alta en grasas y encontraron que la cantidad de lípidos y calorías totales eran significativamente más altas que los controles concluyendo que la composición nutricional de la dieta dada a las ratas, particularmente la cantidad de ácidos grasos saturados puede haber contribuido a estos resultados. De acuerdo con Oliveira et al., 2011, el perfil de ácidos grasos lácteos de las madres que consumen una dieta alta en grasas se asemeja al perfil de la dieta materna. Por lo tanto, la composición de los ácidos grasos en la leche puede influir de gran manera en el peso corporal de la descendencia.

La salud materna y la composición de su dieta en el que se desarrolla la descendencia durante el periodo perinatal es otro factor que promueve la formación de obesidad. La evidencia de estudios epidemiológicos y modelos animales indica que la dieta materna y el estado metabólico juegan un papel importante en la programación del circuito neuronal que regula el comportamiento, lo que resulta en consecuencias a largo plazo en la descendencia (Sullivan, Nousen, & Chamlou, 2014). La dieta materna influye directamente en el comportamiento de la descendencia al afectar el entorno intrauterino. Aún se desconocen los mecanismos por los cuales la dieta materna y el perfil metabólico conforman el ambiente perinatal, pero

investigaciones recientes han encontrado que el aumento en citocinas inflamatorias, nutrientes como glucosa y ácidos grasos y hormonas como insulina y leptina, afectan el ambiente de desarrollo de la descendencia (Ferro Cavalcante et al., 2014).

Por otro lado, se han investigado los efectos de la suplementación dietética con uno o varios compuestos bioactivos en ratas hembras y su impacto en la descendencia como posible estrategia para controlar o prevenir el desarrollo de la obesidad en la descendencia. Así, en nuestro estudio, ratas hembras fueron categorizadas en tres grupos: control, dieta obesogénica y dieta obesogénica más suplementación de naringenina-7-*O*-rutinosido (30 mg/kg de peso corporal) y kaempferol-3-*O*-glucósido (15 mg/kg de peso corporal) por 10 semanas abarcando la etapa perinatal (tres semanas antes de la concepción, gestación y lactancia). Una vez que la descendencia terminó con la etapa de lactancia se alimentó con dieta estándar.

En el nacimiento, la descendencia del grupo de ratas madres alimentadas con dieta obesogénica más suplementación (OB+S) tuvo menor peso al nacer que el grupo Control. De la semana 3 a la 8 de vida se observó una diferencia significativa entre los grupos OB y OB+S, siendo este último el de mayor peso, sin embargo, para la semana 15 de vida, se notó una tendencia y en la semana 16 de vida, el peso corporal se revirtió teniendo estadísticamente más peso el grupo OB que el grupo OB+S.

Otros estudio, por ejemplo el realizado por Tanaka et al., 2017, han investigado si la ingesta del compuesto bioactivo resveratrol (20 mg/kg de peso corporal al día) en la dieta de las ratas hembras durante la lactancia afecta a su descendencia. Después de la lactancia las crías se mantuvieron con una dieta estándar hasta el sacrificio a las 36 semanas de vida. A diferencia de nuestra

investigación, los descendientes adultos de madres que recibieron resveratrol durante la lactancia tuvieron un menor peso corporal desde la cuarta semana de lactancia hasta la edad adulta pero no se observaron cambios significativos en la ingesta relativa de alimentos. Estos resultados indicaron que la ingesta materna de resveratrol durante la lactancia moduló positivamente el metabolismo lipídico al proteger la descendencia contra el aumento de peso corporal exagerado.

En el estudio transgeneracional de Kataoka, Norikura, & Sato, 2018, evaluó una dieta baja en proteína (8% de proteína) durante la gestación y lactancia en ratas hembra. Durante la lactancia se suplementó con extracto de té verde (0.24%). Después a las crías se categorizaron en cinco grupos dependiendo de la dieta experimental que se les otorgó al finalizar la lactancia: normal de proteína con normal contenido de grasa, bajo de proteína con normal contenido de grasa, bajo en proteína con alto contenido de grasa, bajo en proteína con alto contenido de grasa y bajo en suplementación (0.12%) y bajo en proteína con alto contenido de grasa y alto en suplementación (0.24%). En los días 15 y 20 postnatal, el peso de las crías de los grupos bajos en proteína, bajos en proteína con suplementación baja y alta fue significativamente más bajo que el grupo con los niveles de proteína normal. Sin embargo, a la semana 45 el peso de las crías con dieta baja en proteína, pero alta en grasa tuvo un aumento de peso corporal significativamente mayor que las ratas con dieta baja en proteína con contenido normal de grasa. En nuestro estudio, tuvimos resultados similares por lo que sugerimos que los niveles de proteína también pueden tener efectos en el peso de la descendencia.

11.3 La suplementación dietética materna con naringenina-7-O-rutinosido y kaempferol-3-O-glucósido disminuye la ganancia de peso del hígado en la descendencia

Los efectos a largo plazo de la nutrición materna en la fisiología y el metabolismo de la descendencia están relacionados con el crecimiento y desarrollo de órganos importantes como hígado, páncreas, riñón, hipotálamo y corazón, debido a la rápida proliferación celular durante la vida fetal y neonatal. Relacionado a esto, el hígado desempeña muchas funciones en la coordinación del metabolismo por lo que los cambios en el fenotipo hepático pueden tener consecuencias metabólicas a largo plazo (Won et al., 2017). En nuestro estudio, el peso del hígado de la descendencia fue de sumo interés por la tendencia del resultado ente grupos. El grupo OB+S resultó tener un menor peso de tejido hepático ajustado a peso corporal a comparación con el grupo OB y sorpresivamente, aún menor que el tejido hepático del grupo Control. Sin embargo, no hubo diferencia significativa en el peso del hígado entre el grupo OB y Control.

En el estudio de Caimari et al., 2017, evaluaron si la administración con extracto de procianidina de semilla de uva (GSPE) durante la lactancia en ratas provoca efectos beneficioso en su descendencia. Las ratas madres se dividieron en dos grupos dependiendo de la alimentación durante la lactancia: un grupo con leche condensada baja en grasa (VEH) y el segundo grupo con leche condensada baja en grasa suplementada con GSPE (100 mg/kg de peso corporal al día). A la descendencia, después de la lactancia se le dividió en cuatro grupos: dieta control-VEH, dieta control-GSPE, dieta de cafetería-VEH, dieta de cafetería-GSPE. A diferencia de nuestro estudio, la investigación de Caimari y colaboradores solo midió el peso del hígado de las ratas madres encontrando una disminución significativa en el grupo suplementado con GSPE a comparación del grupo VEH. Sin embargo, ellos relacionan este resultado con

la baja ingesta que se observó del grupo GSPE más que la suplementación por si sola. Por lo que los investigadores sugieren estudiar otros mecanismos de regulación de la ingesta como posibles factores implicados en el peso de tejido hepático, además de la suplementación con GSPE.

En el estudio de Arias, Macarulla, Aguirre, Miranda, & Portillo, 2015, se evaluó el efecto de una combinación de quercetina y resveratrol en hígado en un modelo de obesidad dietética. Las ratas fueron divididas en cuatro grupos: control, dieta alta en grasa suplementado con quercetina (30 mg/kg/día), resveratrol (15 mg/kg/día) y ambos flavonoides (15 y 30 mg/kg/día) por 6 semanas. El peso del hígado se redujo significativamente en las ratas tratadas con ambos flavonoides a comparación con las ratas suplementadas por separado. De acuerdo con este resultado la cantidad de triglicéridos y colesterol también disminuyó en el grupo suplementado con ambos flavonoides. Aunque en nuestro estudio las ratas crías no fueron suplementadas con flavonoides, el efecto de la suplementación materna es similar al encontrado en el estudio de Arias y colaboradores. La suplementación materna con ambos flavonoides resultó en una disminución de peso en el hígado de la descendencia por lo que hipotetizamos que la combinación de los flavonoides puede tener una relación con los niveles del perfil lipídico.

En general, la lipólisis en el tejido adiposo blanco es el principal contribuyente a las concentraciones séricas de ácidos grasos libres (Gesta, Tseng, & Kahn, 2007). Sin embargo, este no es el caso en la vida fetal, ya que el tejido adiposo blanco solo comienza a desarrollarse a la mitad del tercer trimestre en humanos y primates no humanos y después del nacimiento en los roedores (Bruce et al., 2009). Se ha demostrado en primates no humanos que las dietas obesogénicas maternas inducen un aumento en el peso del hígado fetal y que las concentraciones de glicerol en el plasma fetal y materno están

fuertemente correlacionados (McCurdy et al., 2009). La acumulación de grasa en el hígado fetal puede así originarse directamente de la transferencia de lípidos de la madre y representa un “primer golpe” de toxicidad durante el desarrollo de la vida temprana (M. Li, Reynolds, Segovia, Gray, & Vickers, 2015).

11.4 La suplementación dietética materna con naringenina-7-O-rutinosido y kaempferol-3-O-glucósido mejora la sensibilidad a la insulina y los niveles de leptina sérica en la descendencia

Actualmente se han realizado estudios para evaluar los resultados sobre los efectos transgeneracionales de la obesidad materna en la descendencia (Soares et al., 2018). Los estudios clínicos y experimentales muestran que los cambios intrauterinos inducidos por la obesidad materna pueden influir en el organismo fetal y llevar a adaptaciones y/o complicaciones metabólicas como la obesidad y comorbilidades relacionadas en la vida adulta (Desai, Beall, & Ross, 2013). En modelos experimentales, la obesidad en las ratas madres esta relacionada con un perfil bioquímico anormal, con ratas crías que presentan niveles elevados de triglicéridos séricos, intolerancia a la glucosa e insulina y leptina elevada, entre otras (H. Chen et al., 2014).

En nuestro estudio, no se encontraron resultados significativos en los niveles de glucosa sérica en ayunas entre los tres grupos de la descendencia. En el estudio de Cerf, Muller, Du Toit, Louw, & Wolfe-Coote, 2006, igualmente se encontró concentraciones normales de glucosa en sangre en la progenie a pesar de que las ratas hembras madres fueron alimentadas con dieta alta en grasa (40% kcal de grasa) durante la gestación y lactancia. Los autores sugieren que este resultado se debe a la persistente exposición a la dieta alta en grasa durante ambas etapas y que esto pudo haber programado a las crías

a adaptarse a la dieta confiriendo la capacidad de mantener la homeostasis de la glucosa.

Por otro lado, se observó un aumento significativo en los niveles séricos de insulina, HOMA-IR entre el grupo Control y OB, siendo el grupo OB el de mayores niveles. En el estudio de Masuyama & Hiramatsu, 2012 se evaluó el efecto de una dieta alta en grasa (62% de grasa) durante la gestación, sobre los niveles bioquímicos de la descendencia. Después de la lactancia, la descendencia se alimentó con dieta estándar reflejando a las 24 semanas valores de insulina y HOMA-IR significativamente elevados a comparación con la descendencia de las ratas madres alimentadas con dieta control. Así como en nuestro estudio, estos datos sugieren que las ratas hembras gestantes alimentadas con una dieta alta en grasa muestran efectos perjudiciales en el metabolismo de sus crías, en específico en una deficiente señalización de insulina periférica, predisponiéndolos a alteraciones metabólicas en la vida adulta a pesar de haber sido alimentados con dieta estándar (Srinivasan, Katewa, Palaniyappan, Pandya, & Patel, 2006). Un estudio adicional demostró que una exposición a una dieta alta en grasa en la etapa gestacional tiene el potencial de programar la capacidad gluconeogénica en la descendencia a través de modificaciones epigenéticas, lo que podría conducir a una sensibilidad a la insulina alterada en la edad adulta (Strakovsky, Zhang, Zhou, & Pan, 2011).

Por otro lado, estudios han demostrado que la suplementación materna con polifenoles durante la etapa gestacional y lactancia mejora el desarrollo de la descendencia, reduciendo la acumulación de grasa corporal y trastornos metabólicos asociados como la inflamación y la resistencia a la insulina y leptina en la vida adulta (Oster et al., 2016). Al analizar si la suplementación materna con flavonoides durante la etapa perinatal puede tener un efecto sobre la descendencia encontramos que los niveles de insulina y leptina en suero

eran significativamente menores en el grupo OB+S a comparación con el grupo OB.

En relación a los resultados, en el estudio de Zou et al., 2017, se evaluó los efectos benéficos de la suplementación dietética materna con resveratrol en los parámetros bioquímicos de la descendencia. En comparación con los descendientes de las madres alimentadas con dieta control y control más resveratrol, la descendencia de las madres alimentadas con dieta alta en grasa mostró concentraciones séricas más altas de triglicéridos e insulina, que fueron atenuados por el tratamiento con resveratrol a un nivel comparable con el grupo control. Así como en nuestro estudio, estos datos sugieren que la suplementación con resveratrol materna previene la obesidad inducida por la dieta y aumenta la sensibilidad a la insulina en la edad adulta por lo que la suplementación materna con flavonoides podría tener un efecto positivo sobre la homeostasis metabólica en la descendencia, en específico, en la mejora de la señalización de la insulina periférica previniendo un desbalance en la homeostasis de la glucosa sérica (Santangelo, Vari, Scazzocchio, Filesì, & Masella, 2014).

Aunque en los estudios de Shen et al., 2012 y Ueda & Ashida, 2012, no se evaluó el efecto transgeneracional, ambos analizaron el efecto de la suplementación con extracto de té verde en ratas alimentadas con dieta obesogénica. En las dos investigaciones se observó una disminución tanto en los niveles de leptina como en HOMA-IR, respectivamente. Lu, Zhu, Shen, & Gao, 2012, argumentan que los beneficios de los flavonoides sobre los resultados fisiológicos pueden ser debido a una regulación a nivel molecular. Igualmente mencionan que esta regulación puede ser relacionada a genes que se vinculan con la obesidad, actividad antiinflamatoria o el metabolismo ya que

existe considerable evidencia que la regulación de los genes desempeña funciones críticas en la patogénesis de la obesidad.

Es por esto que, para profundizar en los mecanismos moleculares implicados en los efectos encontrados en este estudio, se analizó la expresión de genes candidatos como posibles reguladores del metabolismo lipídico y glucídico que puedan ser responsables de la prevención del desarrollo de la obesidad.

11.5 Efecto de la suplementación dietética con narirutina y kaempferol-3-O-glucósido durante la etapa perinatal en ratas Wistar hembras, sobre la expresión génica de GCK, FASn y SOCS3 en el hígado de la descendencia adulta.

Existe un amplio espectro de influencias predominantemente maternas, que están claramente relacionadas con el entorno intrauterino alterado y, por lo tanto, se asocian con un resultado metabólico alterado en la descendencia (Keleher et al., 2018). Este entorno intrauterino alterado está fuertemente asociado con el desarrollo fetal modificado, que puede ser causado por diferentes vías moleculares relacionadas con alteraciones estructurales y funcionales durante el desarrollo de la descendencia (N. Zhang, 2015).

El estudio de Dolinoy y colaboradores ha sido un trabajo clave en el estudio de la alimentación materna y su efecto en la descendencia a través de mecanismos moleculares (Dolinoy et al., 2006). Así, en nuestra investigación se analizó el efecto de la suplementación materna, tres semanas antes, durante la gestación y lactancia, con narirutina y kaempferol sobre la expresión génica de tres genes en la descendencia adulta: GCK relacionado con el metabolismo de

la glucosa, FASn asociado con la síntesis de ácidos grasos de cadena larga y SOCS3 vinculado con la resistencia a la insulina.

La glucoquinasa (GCK) es una enzima que pertenece a la familia hexoquinasa, es encargada del primer paso de la glucólisis y transfiere un grupo fosfato desde una molécula de alta energía a otra. En este caso, la enzima GCK fosforila la glucosa, a partir de ATP, para convertirla en glucosa-6-fosfato. Este proceso es el inicio de la vía principal del metabolismo de la glucosa por donde se obtendrá mas energía o almacenará en forma de glucógeno.

En la presente investigación se encontró una sobreexpresión de GCK en el hígado de las ratas crías macho del grupo materno alimentado con dieta obesogénica más suplementación (OB+S) en comparación con el grupo alimentado solamente con la dieta obesogénica (OB). Así mismo, el grupo OB+S mostró valores normales de glucosa sérica en ayunas y una disminución de los niveles de insulina sérica en comparación con el grupo OB. Esto podría indicar que los niveles circulantes de glucosa entran al hígado, señalando un aumento en la sensibilidad a la insulina y por tanto observando un aumento en los niveles de ARNm de GCK hepático activando la vía de la glucólisis (Kim, Keogh, & Clifton, 2016). En este sentido, al calcular el índice HOMA se obtiene que el grupo OB+S mejoró la sensibilidad a la insulina en comparación con el grupo OB.

En un estudio realizado por Wolfram et al., 2006, evaluaron la tolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina en ratones db/db suplementados con epigallocatequina galato (EGCG) durante 5 a 7 semanas. La suplementación con EGCG (2.5 - 10.0 g / kg de peso corporal al día) dió como resultado una

disminución de los niveles de glucosa en sangre de una manera dosis-dependiente. Y al analizar los resultados moleculares, se observa que el tratamiento con EGCG aumentó los niveles de ARNm de la glucoquinasa hepática (enzima glucógena), la carnitina palmitoil transferasa-1 β y disminuyó la expresión de la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK). Los autores sugirieron que los mecanismos potenciales para explicar la mejoría de la diabetes mellitus tipo 2 a través de la suplementación dietética de EGCG podría ser la reducción de la producción endógena de glucosa en el hígado.

Por otro lado, el estudio transgeneracional de Cerf, Muller, Du Toit, Louw, & Wolfe-Coote, 2006, demostró que las crías de ratas hembras alimentadas con dieta alta en grasa durante la gestación y lactancia tenían una expresión disminuida de GCK en páncreas. Los autores sugieren que esta disminución puede comprometer las células hepáticas y células β del páncreas sobre los niveles de glucosa e insulina séricos, respectivamente. De igual manera, en el presente estudio, se encontraron niveles bajos de ARNm de GCK hepático en el grupo OB. Además, los niveles de insulina sérica en ayunas del grupo OB se encuentran significativamente aumentados en comparación del grupo OB+S, así como el índice HOMA-IR, reflejando de nuevo, un defecto en la señalización de la insulina en el grupo OB.

Sin embargo, el grupo OB+S muestra niveles disminuidos de insulina sérica imitando de manera muy similar el efecto del grupo Control ya que no hay diferencia significativa entre estos dos grupos. Estos resultados ayudan a respaldar la hipótesis de los investigadores Hales & Barker, 2013, sobre como la nutrición durante periodos críticos de desarrollo, como en la etapa gestacional y lactancia, programa procesos metabólicos para la adaptación de este nivel particular de nutrición durante toda la vida. Por otra parte, sugerimos que la suplementación con flavonoides puede tener un efecto protector

antihiperglucemiante natural mediante la regulación de la expresión de GCK hepático que afecta directamente los niveles de glucosa e insulina en sangre (Hanhineva et al., 2010).

Por otro lado, en relación a la expresión de FASn y SOCS3, no hubo diferencia significativa entre los grupos OB y OB+S. El gen FASn codifica para la enzima ácido graso sintasa (FAS) donde su función principal es catalizar la síntesis de largas cadenas de ácidos grasos a partir de acetil-CoA y malonil-CoA en presencia de NADPH. Se conoce que la sobreexpresión del gen FASn aumenta la lipogénesis contribuyendo al aumento de la masa grasa y el peso corporal (Lenhard, 2011).

Se han identificado reguladores fisiológicos clave para la expresión de FASn tales como la glucosa e insulina, entre otros (Abdel-Magid, 2015). En algunas afecciones patológicas tales como la obesidad, la expresión del gen FASn se encuentra irregular. En roedores, la lipogénesis elevada desempeña un papel determinante en el aumento de masa grasa que caracteriza el estado de obesidad (Boizard et al., 1998). Igualmente los depósitos adiposos hipertróficos de animales en los que la obesidad resulta de la interrupción del sistema de señalización de leptina (modelos animales genéticamente modificados como, por ejemplo, ob/ob o db/db ratones) exhiben niveles altos de actividades lipogénicas (D. Wang & Dubois, 2012).

En el estudio de Prip-Buus et al., 1995, se investigó sobre la regulación de FASn. Los autores argumentan que estudios previos han observado que tanto la mezcla de glucosa y hormonas como, por ejemplo, insulina, regulan la expresión de FASn. Por lo que evaluaron si la expresión del gen GCK podría ser un requisito previo para la estimulación de la expresión de FASn en

respuesta a glucosa. La investigación se realizó *in vitro* utilizando hepatocitos que se cultivaron 48 horas en ausencia de glucosa, pero en presencia de insulina, dexametasona y triyodotironina. En estas condiciones, los niveles de ARNm y la actividad enzimática de la GCK aumentaron marcadamente pero no se acumuló ARNm de FASn. Cuando estos hepatocitos fueron expuestos a varios niveles de glucosa, aumentó la expresión FASn rápidamente. La estimulación de FASn con glucosa solo se observó en hepatocitos que expresaban actividad de GCK. Por lo que los investigadores concluyeron que la importancia de la expresión de GCK para la inducción de la expresión de FASn por medio del suministro de glucosa se debe a la correlación entre las concentraciones de glucosa-6-fosfato y los niveles de ARNm de FASn. Sin embargo, aunque en nuestro estudio si obtuvimos una diferencia significativa en la expresión de GCK, éstos no fueron suficientes para crear un efecto en los niveles de expresión del gen FASn.

Por otro lado, en un estudio transgeneracional reciente de Tanaka et al., 2017, se analizó la ingesta de resveratrol materna durante la lactancia sobre la lipogénesis en la descendencia de ratas macho adultas. Las ratas Wistar hembras se dividieron en dos grupos: ambos con dieta estándar pero un grupo suplementado con resveratrol (20 mg/kg al día) durante las tres semanas de la lactancia. Después de la lactancia, todas las ratas crías macho fueron alimentados con dieta estándar por 36 semanas. Los resultados mostraron una regulación negativa significativa de los niveles de FASn y acetil-CoA carboxilasa (ACC) en la descendencia del grupo de las madres suplementadas. Estos resultados indicaron que la ingesta de resveratrol materna atenuó la síntesis de ácidos grasos y triacilglicerol hepático en la descendencia en la edad adulta. En nuestro estudio, a diferencia del estudio de Tanaka y colaboradores, no hubo diferencia significativa en los niveles de ARNm de FASn, esto se puede deber a la edad de las crías macho al momento del sacrificio para obtener los tejidos a analizar, ya que nuestro estudio fue diseñado para 16 semanas de vida de las

crías. Además es importante considerar que la descendencia fue alimentada con dieta estándar a diferencia de las dietas experimentales de sus madres. Esto nos hace sugerir que en presencia de una dieta alta en grasa puede haber un aumento de la expresión de ARNm del gen FASn y que puede existir una programación metabólica en la regulación de este gen dependiente de la edad (Jensen-Urstad & Semenkovich, 2012).

La transcripción de FASn, un gen central en la lipogénesis de *novo*, es dramáticamente inducida por el ayuno/realimentación e insulina (Latasa, Moon, Kim, & Sul, 2000). Los niveles de ARNm de FASn no son detectables en el hígado de ratones en ayunas pero la realimentación de una dieta alta en hidratos de carbono y libre de grasa aumenta de manera dramática los niveles de ARNm de FASn debido a los cambios en la transcripción (Griffin & Sul, 2004). Es importante destacar que, en nuestro estudio, a diferencia de los estudios mencionados, la descendencia de las ratas madres consumieron una dieta estándar durante todo el experimento. Esto puede ser una razón por la cual los niveles de expresión de FASn de los grupos OB y OB+S son similares a los del grupo Control. Además, en la investigación de Griffin y Sul mencionan que el aumento en la secreción o la administración de insulina puede inducir el incremento de la expresión del gen FASn. Sin embargo, en nuestro estudio, el grupo OB parece tener una resistencia a la insulina y el grupo control y OB+S tienen niveles normales de ésta por lo que esta puede ser otra razón por la cual los niveles de FASn se mantienen similares entre los grupos.

Por otro lado, Wakil & Abu-Elheiga, 2009 mencionan que la síntesis de ácidos grasos por FAS requiere acetil-CoA, malonil-CoA y NADPH. En la figura 20 podemos observar como los tres macronutrientes desembocan en la formación de acetil-CoA, no obstante es interesante hacer notar que el acetil-CoA para la formación de palmitato puede redireccionarse por otra vía para la formación del colesterol. Aunque más mecanismos se deben dilucidar para conocer la razón por la cual el acetil-CoA tomará la vía para la formación de colesterol, es una buena teoría que podría explicar los niveles de expresión de FASn en nuestro estudio.

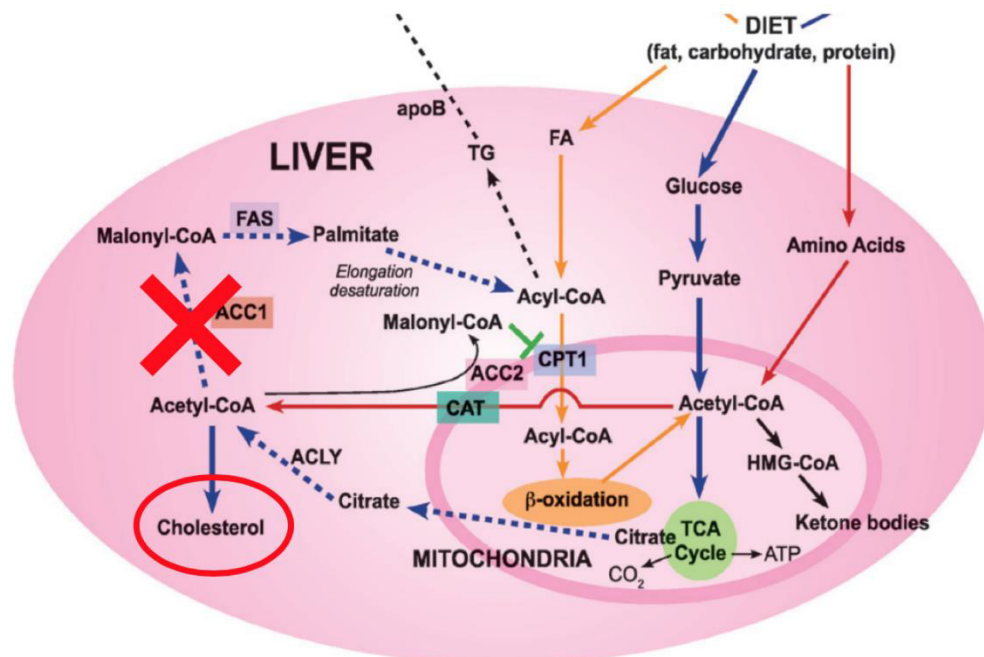


Figura 20. Diagrama general del metabolismo de los macronutrientes en el hígado. Adaptado de Wakil & Abu-Elheiga 2009.

El gen SOCS3 llamado supresor de señalización de citocinas codifica para proteínas que inhiben la señalización de estas moléculas. Otros de sus mecanismos moleculares son la regulación de leptina e insulina en diversos tejidos, incluyendo el hepático (Carow & Rottenberg, 2014). Se conoce que el aumento de expresión de SOCS3 induce la resistencia a la insulina y leptina al actuar como retroalimentación negativa en la vía JAK/STAT3. Estos mecanismos fueron comprobados al utilizar ratones knockout donde se

demonstró que la delección de la enzima SOCS3 mejora la sensibilidad a la insulina y leptina (Wunderlich, Hövelmeyer, & Wunderlich, 2013).

En el estudio de Lambert et al., 2018 se comparó los efectos sobre distintas alteraciones del depósito de tejido adiposo blanco de una combinación de suplementos de polifenoles y ejercicio en ratas obesas resistentes a la insulina. Después de 4 semanas de proporcionarles una dieta alta en grasas (HFD), que previamente se demostró que induce resistencia a la insulina, los animales se dividieron en 4 grupos mientras simultáneamente continuaban con la dieta alta en grasa durante un periodo adicional de 8 semanas. Los grupos fueron los siguientes: HFD, HFD más la suplementación con extracto de polifenol de uva (50 mg/kg al día por 50 mL de agua potable), HFD más entrenamiento físico por 1 hora al día por 5 días a la semana que consistía en correr en una cinta de andar a 32 metros por minuto y HFD con suplementación y entrenamiento de ejercicio. A pesar de que ambas intervenciones fueron capaces de mejorar la inflamación en el tejido adiposo, la suplementación con polifenoles no modificó la cantidad de enzima SOCS3 en ningún depósito de tejido adiposo.

Aunque la metodología de nuestro estudio fue diferente a la del estudio de Lambert y colaboradores, ambos buscábamos conocer el efecto que tiene adicionar factores positivos como el ejercicio y la suplementación con compuestos bioactivos sobre la expresión génica de SOCS3, entre otros. Lo interesante y sorprendente es que tanto el entrenamiento de ejercicio como la suplementación con el polifenol de uva, no causaron ningún efecto en los niveles de ARNm de SOCS3, así como en nuestra investigación.

Igualmente, en otro estudio de Ibars et al., 2017, se evaluó si las proantocianidinas pueden reestablecer de manera apropiada los niveles de leptina en el hipotálamo y tejidos periféricos. Ratas Wistar macho fueron alimentadas con una dieta estándar o una dieta de cafetería durante 13 semanas. Las ratas alimentadas con dieta estándar se les suplementó con el extracto de semilla de uva (25 mg/kg de peso corporal al día) o con un placebo, para los últimos 21 días del período de estudio. No se observaron diferencias significativas en los niveles de ARNm de *Obrb*, *Socs3* y *Ptp1b* entre los tres grupos de animales, indicando que el suplemento de proantocianidina no tuvo efecto sobre la restauración de la sensibilidad a la leptina en este tejido. En nuestra investigación, la descendencia fue alimentada con dieta estándar, a diferencia de las madres que recibieron dietas obesogénicas y obesogénica con suplementación, por lo que puede ser un probable factor por el cual los niveles de SOCS3 no fueron significativos.

Aunque en nuestro proyecto no se midieron marcadores de inflamación, el estudio de Sachithanandan et al., 2010, y otros estudios han demostrado que la inflamación sistémica puede producir una resistencia a la leptina. Además, Sachithanandan y colaboradores observaron que la hiperinsulinemia incrementa la expresión de FASn y SOCS3 hipotalámica creando efectos secundarios como el incremento del apetito y la reducción del gasto de energía. Es evidente la complejidad de la expresión de genes y su efecto en el metabolismo, por lo que se necesitan más estudios que aclaren la programación metabólica entre la suplementación dietética en la etapa perinatal sobre los mecanismos moleculares de la descendencia en edad adulta.

11.6 Discusión general

La suplementación materna con naringenina-7-*O*-rutinosido y kaempferol-3-*O*-glucósido durante la etapa perinatal ha provocado cambios fisiológicos en la descendencia adulta. Los principales cambios se han visto reflejados en la prevención del aumento de peso corporal y de la resistencia a la insulina y

leptina. Una posible explicación es que la suplementación materna con flavonoides programó metabólicamente a la descendencia a través de la regulación génica de GCK, que es un gen regulador clave del almacenamiento de glucosa tanto en células hepáticas como pancreáticas, y responde a los aumentos en la concentración circulante de glucosa iniciando una cascada de señalización que produce la secreción de insulina de las células beta del páncreas y, como consecuencia, la posterior absorción y almacenamiento de glucosa hepática (Figura 21) (Raimondo, Rees, & Gloyn, 2015).

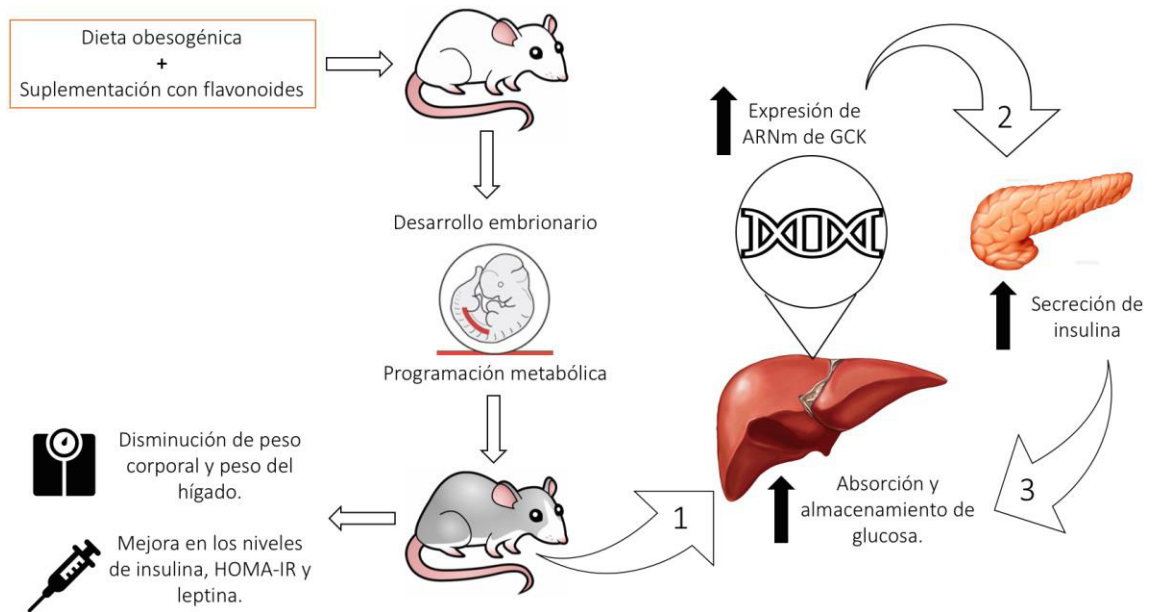


Figura 21. Influencia de la suplementación dietética materna sobre la programación metabólica de la descendencia.

XII. CONCLUSIONES

1. La dieta obesogénica indujo obesidad en ratas Wistar hembras desde el séptimo día provocando alteraciones metabólicas como el aumento de glucosa en ayunas.
2. La dieta obesogénica durante la etapa perinatal indujo un menor peso al nacer en comparación de las ratas crías de madres alimentadas con dieta control y suplementadas.
3. La suplementación materna con narirutina y kaempferol-3-*O*-glucósido durante la etapa perinatal previene el desarrollo de la obesidad en la descendencia adulta.
4. La suplementación materna con narirutina y kaempferol-3-*O*-glucósido durante la etapa perinatal disminuye el peso del hígado en la descendencia adulta.
5. La suplementación materna con narirutina y kaempferol-3-*O*-glucósido durante la etapa perinatal mejora la sensibilidad a la insulina y la hiperleptinemia en la descendencia adulta.
6. La suplementación materna con narirutina y kaempferol-3-*O*-glucósido durante la etapa perinatal regula la expresión génica de GCK hepático en la descendencia adulta.

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Magid, A. F. (2015). Fatty Acid Synthase (FASN) Inhibitors as Potential Treatment for Cancer, Obesity, and Liver Related Disorders. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 6(8), 838–839.
<https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.5b00275>
- Afman, L., & Müller, M. (2006). Nutrigenomics: From Molecular Nutrition to Prevention of Disease. *Journal of the American Dietetic Association*, 106(4), 569–576.
<https://doi.org/10.1016/j.jada.2006.01.001>
- Al-Numair, K. S., Chandramohan, G., Veeramani, C., & Alsaif, M. A. (2015). Ameliorative effect of kaempferol, a flavonoid, on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Redox Report*, 20(5), 198–209.
<https://doi.org/10.1179/1351000214Y.0000000117>
- Algoblan, A., Alalfi, M., & Khan, M. (2014). Mechanism linking diabetes mellitus and obesity. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 7, 587.
<https://doi.org/10.2147/DMSO.S67400>
- Alkhalidy, H., Moore, W., Zhang, Y., McMillan, R., Wang, A., Ali, M., ... Liu, D. (2015). Small Molecule Kaempferol Promotes Insulin Sensitivity and Preserved Pancreatic β -Cell Mass in Middle-Aged Obese Diabetic Mice. *Journal of Diabetes Research*, 2015, 532984. <https://doi.org/10.1155/2015/532984>
- Alsadat, S., Khorami, H., Movahedi, A., Kuzwah, K., Mutalib, A., & Sokhini, M. (2015). PI3K / AKT pathway in modulating glucose homeostasis and its alteration in Diabetes. *Annals of Medical and Biomedical Sciences*, 1(2), 46–55. Retrieved from <http://ambs-journal.co.uk/articles/8-AMBS46-55-20151.pdf>
- Arias, N., Macarulla, M. T., Aguirre, L., Miranda, J., & Portillo, M. P. (2015). Liver delipidating effect of a combination of resveratrol and quercetin in rats fed an obesogenic diet. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 71(3), 569–576.
<https://doi.org/10.1007/s13105-015-0403-2>
- Barquera Cervera, S., Campos-Nonato, I., Rojas, R., & Rivera, J. (2010). Obesidad en México: epidemiología y políticas de salud para su control y prevención. *Gaceta Médica México*, 397–407. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2010/gm106g.pdf>
- Batra, P., & Sharma, A. K. (2013). Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives. *3 Biotech*, 3(6), 439–459. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0117-5>
- Bautista, C. J., Montañó, S., Ramirez, V., Morales, A., Nathanielsz, P. W., Bobadilla, N. A., & Zambrano, E. (2016). Changes in milk composition in obese rats consuming a high-fat diet. *British Journal of Nutrition*, 115(03), 538–546.
<https://doi.org/10.1017/S0007114515004547>
- Bayol, S. A., Simbi, B. H., Bertrand, J. A., & Stickland, N. C. (2008). Offspring from mothers fed a 'junk food' diet in pregnancy and lactation exhibit exacerbated

- adiposity that is more pronounced in females. *The Journal of Physiology*, 586(13), 3219–3230. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.153817>
- Bayol, S. A., Simbi, B. H., & Stickland, N. C. (2005). A maternal cafeteria diet during gestation and lactation promotes adiposity and impairs skeletal muscle development and metabolism in rat offspring at weaning. *The Journal of Physiology*, 567(3), 951–961. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.088989>
- Berndt, J., Kovacs, P., Ruschke, K., Klötting, N., Fasshauer, M., Schön, M. R., ... Blüher, M. (2007). Fatty acid synthase gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia*, 50(7), 1472–1480. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0689-x>
- Bloomfield, F. H., Spiroski, A. M., & Harding, J. E. (2013). Fetal growth factors and fetal nutrition. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 18(3), 118–123. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2013.03.003>
- Boizard, M., Le Liepvre, X., Lemarchand, P., Foufelle, F., Ferré, P., & Dugail, I. (1998). Obesity-related overexpression of fatty-acid synthase gene in adipose tissue involves sterol regulatory element-binding protein transcription factors. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(44), 29164–29171. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.44.29164>
- Boqué, N., Campión, J., Paternain, L., García-Díaz, D. F., Galarraga, M., Por-Tillo, M. P., ... Martínez, J. A. (2009). Influence of dietary macronutrient composition on adiposity and cellularity of different fat depots in Wistar rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 65(4), 387–396. <https://doi.org/10.1007/BF03185934>
- Bruce, K. D., Cagampang, F. R., Argenton, M., Zhang, J., Ethirajan, P. L., Burdge, G. C., ... Byrne, C. D. (2009). Maternal high-fat feeding primes steatohepatitis in adult mice offspring, involving mitochondrial dysfunction and altered lipogenesis gene expression. *Hepatology*, 50(6), 1796–1808. <https://doi.org/10.1002/hep.23205>
- Caimari, A., Mariné-Casadó, R., Boqué, N., Crescenti, A., Arola, L., & Del Bas, J. M. (2017). Maternal intake of grape seed procyanidins during lactation induces insulin resistance and an adiponectin resistance-like phenotype in rat offspring. *Scientific Reports*, 7(1), 12573. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12597-9>
- Calderón-Montaña, J., Burgos-Morón, E., Pérez-Guerrero, C., & López-Lázaro, M. (2011). A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 11(4), 298–344. <https://doi.org/10.2174/138955711795305335>
- Carow, B., & Rottenberg, M. E. (2014). SOCS3, a Major Regulator of Infection and Inflammation. *Frontiers in Immunology*, 5, 58. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00058>
- Cazarolli, L. H., Zanatta, L., Alberton, E. H., Figueiredo, M. S. R. B., Folador, P., Damazio, R. G., ... Silva, F. R. M. B. (2008). Flavonoids: cellular and molecular mechanism of action in glucose homeostasis. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 8(10), 1032–1038. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18782055>
- Cerf, M. E., Muller, C. J., Du Toit, D. F., Louw, J., & Wolfe-Coote, S. A. (2006).

- Hyperglycaemia and reduced glucokinase expression in weanling offspring from dams maintained on a high-fat diet. *The British Journal of Nutrition*, 95(2), 391–396. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16469158>
- Chambers, T. J. G., Morgan, M. D., Heger, A. H., Sharpe, R. M., & Drake, A. J. (2016). High-fat diet disrupts metabolism in two generations of rats in a parent-of-origin specific manner. *Scientific Reports*, 6, 31857. <https://doi.org/10.1038/srep31857>
- Chang, G.-Q., Gaysinskaya, V., Karatayev, O., & Leibowitz, S. F. (2008). Maternal high-fat diet and fetal programming: increased proliferation of hypothalamic peptide-producing neurons that increase risk for overeating and obesity. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(46), 12107–12119. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2642-08.2008>
- Chen, H., Simar, D., Pegg, K., Saad, S., Palmer, C., & Morris, M. J. (2014). Exendin-4 is effective against metabolic disorders induced by intrauterine and postnatal overnutrition in rodents. *Diabetologia*, 57(3), 614–622. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-3132-5>
- Chen, Z., Zheng, S., Li, L., & Jiang, H. (2014). Metabolism of flavonoids in human: a comprehensive review. *Current Drug Metabolism*, 15(1), 48–61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24588554>
- Chirala, S. S., & Wakil, S. J. (2004). Structure and function of animal fatty acid synthase. *Lipids*, 39(11), 1045–1053. <https://doi.org/10.1007/s11745-004-1329-9>
- Choi, S.-W., & Friso, S. (2010). Epigenetics: A New Bridge between Nutrition and Health. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 1(1), 8–16. <https://doi.org/10.3945/an.110.1004>
- Coppola, A., & Moshé, S. L. (2012). Animal models. In *Handbook of clinical neurology* (Vol. 107, pp. 63–98). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52898-8.00004-5>
- Crew, R. C., Waddell, B. J., & Mark, P. J. (2016). Maternal obesity induced by a “cafeteria” diet in the rat does not increase inflammation in maternal, placental or fetal tissues in late gestation. *Placenta*, 39, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.01.002>
- Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26(8), 1001. <https://doi.org/10.1039/b802662a>
- Dauncey, M. J. (2012). Recent advances in nutrition, genes and brain health. *Proceedings of the Nutrition Society*, 71(04), 581–591. <https://doi.org/10.1017/S0029665112000237>
- De Boo, H. A., & Harding, J. E. (2006). The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 46(1), 4–14. <https://doi.org/10.1111/j.1479-828X.2006.00506.x>
- de la Garza, A. L., Etxeberria, U., Haslberger, A., Aumueller, E., Martínez, J. A., & Milagro, F. I. (2015). Helichrysum and Grapefruit Extracts Boost Weight Loss in Overweight Rats Reducing Inflammation. *Journal of Medicinal Food*, 18(8), 890–

898. <https://doi.org/10.1089/jmf.2014.0088>

- Debusk, R. (2010). The role of nutritional genomics in developing an optimal diet for humans. *Nutrition in Clinical Practice*, 25(6), 627–633. <https://doi.org/10.1177/0884533610385700>
- Del Bas, J. M., Crescenti, a, Arola-Arnal, a, Oms-Oliu, G., Arola, L., & Caimari, a. (2015). Grape seed procyanidin supplementation to rats fed a high-fat diet during pregnancy and lactation increases the body fat content and modulates the inflammatory response and the adipose tissue metabolism of the male offspring in youth. *International Journal of Obesity*, 39(1), 7–15. <https://doi.org/10.1038/ijo.2014.159>
- del Bas, J. M., Crescenti, A., Arola-Arnal, A., Oms-Oliu, G., Arola, L., & Caimari, A. (2015). Intake of grape procyanidins during gestation and lactation impairs reverse cholesterol transport and increases atherogenic risk indexes in adult offspring. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(12), 1670–1677. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.08.015>
- Desai, M., Beall, M., & Ross, M. G. (2013). Developmental Origins of Obesity: Programmed Adipogenesis. *Current Diabetes Reports*, 13(1), 27–33. <https://doi.org/10.1007/s11892-012-0344-x>
- Di Marco, I., Flores, L., Naddeo, S., Bustamante, P., & Abrahan, L. (2011). Guía de Práctica Clínica - Obesidad en el Embarazo. *Sarda*, 1–27.
- Dolinoy, D. C., Weidman, J. R., Waterland, R. A., & Jirtle, R. L. (2006). Maternal genistein alters coat color and protects Avy mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome. *Environmental Health Perspectives*, 114(4), 567–572. <https://doi.org/10.1289/EHP.8700>
- Doo, M., & Kim, Y. (2015). Obesity: interactions of genome and nutrients intake. *Preventive Nutrition and Food Science*, 20(1), 1–7. <https://doi.org/10.3746/pnf.2015.20.1.1>
- Drazen, J. M. (2015). Califf for the FDA. *Nejm*, 177–179. <https://doi.org/10.1056/NEJMe1513828>
- Eberle, C., & Ament, C. (2012). Diabetic and metabolic programming: mechanisms altering the intrauterine milieu. *ISRN Pediatrics*, 2012, 975685. <https://doi.org/10.5402/2012/975685>
- Ericsson, A. C., Crim, M. J., & Franklin, C. L. (2013). A brief history of animal modeling. *Missouri Medicine*, 110(3), 201–205. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23829102>
- Farías, M. (2013). Obesidad materna: severo problema de salud pública en Chile. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*, 78(6), 409–412. <https://doi.org/10.4067/S0717-75262013000600001>
- Fenton, P. F., & Dowling, M. T. (1953). Studies on Obesity. *The Journal of Nutrition*, 49(2), 319–331. <https://doi.org/10.1093/jn/49.2.319>
- Ferro Cavalcante, T. C., Marcelino da Silva, A. A., Lira, M. C. A., Amaral Almeida, L. C.

- do, Marques, A. P. J., & Nascimento, E. do. (2014). Early exposure of dams to a westernized diet has long-term consequences on food intake and physiometabolic homeostasis of the rat offspring. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *65*(8), 989–993. <https://doi.org/10.3109/09637486.2014.950208>
- Flores-Padilla, L., Solorio-Páez, I. C., Melo-Rey, M. L., & Trejo-Franco, J. (2014). Embarazo y obesidad: riesgo para desarrollo de diabetes gestacional en la frontera norte de México DIABETES, OBESIDAD Y SÍNDROME METABÓLICO, *150*(1), 73–78.
- Gesta, S., Tseng, Y.-H., & Kahn, C. R. (2007). Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source. *Cell*, *131*(2), 242–256. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.004>
- Gicquel, C., El-Osta, A., & Le Bouc, Y. (2008). Epigenetic regulation and fetal programming. *Best Practice and Research in Clinical Endocrinology and Metabolism*, *22*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2007.07.009>
- Gluckman, P. D., Hanson, M. A., Cooper, C., & Thornburg, K. L. (2008). Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *The New England Journal of Medicine*, *359*(1), 61–73. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0708473>
- Goldwasser, J., Cohen, P. Y., Yang, E., Balaguer, P., Yarmush, M. L., & Nahmias, Y. (2010). Transcriptional Regulation of Human and Rat Hepatic Lipid Metabolism by the Grapefruit Flavonoid Naringenin: Role of PPAR α , PPAR γ and LXR α . *PLoS ONE*, *5*(8), e12399. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012399>
- Gracia, A., Elcoroaristizabal, X., Fernández-Quintela, A., Miranda, J., Bediaga, N. G., M de Pancorbo, M., ... Portillo, M. P. (2014). Fatty acid synthase methylation levels in adipose tissue: effects of an obesogenic diet and phenol compounds. *Genes & Nutrition*, *9*(4), 411. <https://doi.org/10.1007/s12263-014-0411-9>
- Griffin, M. J., & Sul, H. S. (2004). Insulin regulation of fatty acid synthase gene transcription: Roles of USF and SREBP-1c. *IUBMB Life*, *56*(10), 595–600. <https://doi.org/10.1080/15216540400022474>
- Guelinckx, I., Devlieger, R., Beckers, K., & Vansant, G. (2008). Maternal obesity: Pregnancy complications, gestational weight gain and nutrition. *Obesity Reviews*, *9*(2), 140–150. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2007.00464.x>
- Guilherme, A., Virbasius, J. V., Puri, V., & Czech, M. P. (2008). Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *9*(5), 367–377. <https://doi.org/10.1038/nrm2391>
- Haddad, F., & Baldwin, K. M. (2010). Reverse Transcription of the Ribonucleic Acid: The First Step in RT-PCR Assay. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 630, pp. 261–270). https://doi.org/10.1007/978-1-60761-629-0_17
- Hajiaghaalipour, F., Khalilpourfarshbafi, M., & Arya, A. (2015). Modulation of glucose transporter protein by dietary flavonoids in type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Biological Sciences*, *11*(5), 508–524. <https://doi.org/10.7150/ijbs.11241>
- Hales, C., & Barker, D. (2013). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the

- thrifty phenotype hypothesis. *International Journal of Epidemiology*, 42(5), 1215–1222. <https://doi.org/10.1093/ije/dyt133>
- Hanhineva, K., Törrönen, R., Bondia-Pons, I., Pekkinen, J., Kolehmainen, M., Mykkänen, H., & Poutanen, K. (2010). Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), 1365–1402. <https://doi.org/10.3390/ijms11041365>
- Hariri, N., & Thibault, L. (2010). High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutrition Research Reviews*, 23(2), 270–299. <https://doi.org/10.1017/S0954422410000168>
- Hashmi, A., Soomro, J. A., Iqbal, Z., Soomro, T. K., & Saleem, K. (2012). Maternal Obesity a Global Health Problem and its Implications on Maternal and Fetal Health. *Reproductive System & Sexual Disorders*, 01(01). <https://doi.org/10.4172/2161-038X.1000103>
- He, H., Yu, W.-G., Yang, J., Ge, S., & Lu, Y.-H. (2016). Multiple Comparisons of Glucokinase Activation Mechanisms of Five Mulberry Bioactive Ingredients in Hepatocyte. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(12), 2475–2484. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02823>
- Hernández, M., Rivera, J., Shamah, T., Cuevas, L., Gómez, L., Gaona, E., ... García, D. (2016). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016, 2016(Ensanut), 1–154.
- Hesketh, J. (2013). Personalised nutrition: how far has nutrigenomics progressed? *European Journal of Clinical Nutrition*, 67(5), 430–435. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2012.145>
- Higa, T. S., Spinola, A. V., Fonseca-Alaniz, M. H., & Anna Evangelista, F. S. (2014). Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, 6(1), 47–54.
- Hocher, B. (2014). More than genes: The advanced fetal programming hypothesis. *Journal of Reproductive Immunology*, 104–105(1), 8–11. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2014.03.001>
- Hruby, A., & Hu, F. B. (2015). The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *PharmacoEconomics*, 33(7), 673–689. <https://doi.org/10.1007/s40273-014-0243-x>
- Huang, T., & Hu, F. B. (2013). Gene-environment interactions and obesity: recent developments and future directions, 24–27. <https://doi.org/10.1186/1755-8794-8-S1-S2>
- Huong, D. T. T., Takahashi, Y., & Ide, T. (2006). Activity and mRNA levels of enzymes involved in hepatic fatty acid oxidation in mice fed citrus flavonoids. *Nutrition*, 22(5), 546–552. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2005.11.006>
- Ibars, M., Ardid-Ruiz, A., Suárez, M., Mugerza, B., Bladé, C., & Aragonès, G. (2017). Proanthocyanidins potentiate hypothalamic leptin/STAT3 signalling and Pomc gene expression in rats with diet-induced obesity. *International Journal of Obesity (2005)*, 41(1), 129–136. <https://doi.org/10.1038/ijo.2016.169>

- INGLE, D. J. (1949). A simple means of producing obesity in the rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 72(3), 604. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15400809>
- Jensen-Urstad, A. P. L., & Semenkovich, C. F. (2012). Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: housekeeper or messenger? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1821(5), 747–753. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2011.09.017>
- Johnson, I. T., & Belshaw, N. J. (2014). Nutrition and epigenetics: An emerging field. *Nutrition Bulletin*, 39(4), 313–321. <https://doi.org/10.1111/nbu.12120>
- Jorge, A. P., Horst, H., Sousa, E. de, Pizzolatti, M. G., & Silva, F. R. M. B. (2004). Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on 14C-glucose uptake in rat soleus muscle. *Chemico-Biological Interactions*, 149(2–3), 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2004.07.001>
- Kataoka, S., Norikura, T., & Sato, S. (2018). Maternal green tea polyphenol intake during lactation attenuates kidney injury in high-fat-diet-fed male offspring programmed by maternal protein restriction in rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 56, 99–108. <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2018.01.012>
- Kawser Hossain, M., Abdal Dayem, A., Han, J., Yin, Y., Kim, K., Kumar Saha, S., ... Cho, S.-G. (2016a). Molecular Mechanisms of the Anti-Obesity and Anti-Diabetic Properties of Flavonoids. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(4), 569. <https://doi.org/10.3390/ijms17040569>
- Kawser Hossain, M., Abdal Dayem, A., Han, J., Yin, Y., Kim, K., Kumar Saha, S., ... Cho, S.-G. (2016b). Molecular Mechanisms of the Anti-Obesity and Anti-Diabetic Properties of Flavonoids. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(4), 569. <https://doi.org/10.3390/ijms17040569>
- Keleher, M. R., Zaidi, R., Shah, S., Oakley, M. E., Pavlatos, C., El Idrissi, S., ... Cheverud, J. M. (2018). Maternal high-fat diet associated with altered gene expression, DNA methylation, and obesity risk in mouse offspring. *PloS One*, 13(2), e0192606. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192606>
- Kelly, T., Yang, W., Chen, C.-S., Reynolds, K., & He, J. (2008). Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *International Journal of Obesity*, 32(9), 1431–1437. <https://doi.org/10.1038/ijo.2008.102>
- Kim, Y., Keogh, J. B., & Clifton, P. M. (2016). Polyphenols and Glycemic Control. *Nutrients*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/nu8010017>
- King, V., Dakin, R. S., Liu, L., Hadoke, P. W. F., Walker, B. R., Seckl, J. R., ... Drake, A. J. (2013). Maternal obesity has little effect on the immediate offspring but impacts on the next generation. *Endocrinology*, 154(7), 2514–2524. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1013>
- Kleinert, M., Clemmensen, C., Hofmann, S. M., Moore, M. C., Renner, S., Woods, S. C., ... Tschöp, M. H. (2018). Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, 14(3), 140–162. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.161>

- Kozłowska, A., & Szostak-Wegierek, D. (2014). Flavonoids--food sources and health benefits. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, *65*(2), 79–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25272572>
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *TheScientificWorldJournal*, *2013*, 162750. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>
- Kussmann, M., Krause, L., & Siffert, W. (2010). Nutrigenomics: Where are we with genetic and epigenetic markers for disposition and susceptibility? *Nutrition Reviews*, *68*(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00326.x>
- Kussmann, M., Raymond, F., & Affolter, M. (2006). OMICS-driven biomarker discovery in nutrition and health. *Journal of Biotechnology*, *124*(4), 758–787. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.02.014>
- Lagisz, M., Blair, H., Kenyon, P., Uller, T., Raubenheimer, D., & Nakagawa, S. (2015). Little appetite for obesity: meta-analysis of the effects of maternal obesogenic diets on offspring food intake and body mass in rodents. *International Journal of Obesity*, *39*(August), 1–10. <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.160>
- Lambert, K., Hokayem, M., Thomas, C., Fabre, O., Cassan, C., Bourret, A., ... Bisbal, C. (2018). No Additive Effects of Polyphenol Supplementation and Exercise Training on White Adiposity Determinants of High-Fat Diet-Induced Obese Insulin-Resistant Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2018*, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2018/7406946>
- Langley-Evans, S. C., & McMullen, S. (2010). Developmental origins of adult disease. *Medical Principles and Practice*, *19*(2), 87–98. <https://doi.org/10.1159/000273066>
- Latasa, M. J., Moon, Y. S., Kim, K. H., & Sul, H. S. (2000). Nutritional regulation of the fatty acid synthase promoter in vivo: sterol regulatory element binding protein functions through an upstream region containing a sterol regulatory element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(19), 10619–10624. <https://doi.org/10.1073/pnas.180306597>
- Leddy, M. A., Power, M. L., & Schulkin, J. (2008). The impact of maternal obesity on maternal and fetal health. *Reviews in Obstetrics & Gynecology*, *1*(4), 170–178. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19173021>
- Lee, E.-R., Kang, G.-H., & Cho, S.-G. (2007). Effect of flavonoids on human health: old subjects but new challenges. *Recent Patents on Biotechnology*, *1*(2), 139–150. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19075837>
- Lenhard, J. M. (2011). Lipogenic enzymes as therapeutic targets for obesity and diabetes. *Current Pharmaceutical Design*, *17*(4), 325–331. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21375498>
- Li, J. M., Che, C. T., Lau, C. B. S., Leung, P. S., & Cheng, C. H. K. (2006). Inhibition of intestinal and renal Na⁺-glucose cotransporter by naringenin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *38*(5–6), 985–995. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.10.002>

- Li, M., Reynolds, C. M., Segovia, S. A., Gray, C., & Vickers, M. H. (2015). Developmental Programming of Nonalcoholic Fatty Liver Disease : The Effect of Early Life Nutrition on Susceptibility and Disease Severity in Later Life, *2015*(2). <https://doi.org/10.1155/2015/437107>
- Li, S.-W., Yu, H.-R., Sheen, J.-M., Tiao, M.-M., Tain, Y.-L., Lin, I.-C., ... Huang, L.-T. (2017). A maternal high-fat diet during pregnancy and lactation, in addition to a postnatal high-fat diet, leads to metabolic syndrome with spatial learning and memory deficits: beneficial effects of resveratrol. *Oncotarget*, *8*(67), 111998–112013. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22960>
- Lopez-Ortega, M., & Arroyo, P. (2016). Anthropometric characteristics and body composition in Mexican older adults: age and sex differences. *The British Journal of Nutrition*, *115*(3), 490–499. <https://doi.org/10.1017/S0007114515004626>
- Lu, C., Zhu, W., Shen, C.-L., & Gao, W. (2012). Green Tea Polyphenols Reduce Body Weight in Rats by Modulating Obesity-Related Genes. *PLoS ONE*, *7*(6), e38332. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038332>
- Lumey, L. H., Ravelli, A. C., Wiessing, L. G., Koppe, J. G., Treffers, P. E., & Stein, Z. A. (1993). The Dutch famine birth cohort study: design, validation of exposure, and selected characteristics of subjects after 43 years follow-up. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, *7*(4), 354–367. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8290375>
- Massa, M. L., Gagliardino, J. J., & Francini, F. (2011). Liver glucokinase: An overview on the regulatory mechanisms of its activity. *IUBMB Life*, *63*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1002/iub.411>
- Masuyama, H., & Hiramatsu, Y. (2012). Effects of a High-Fat Diet Exposure *in Utero* on the Metabolic Syndrome-Like Phenomenon in Mouse Offspring through Epigenetic Changes in Adipocytokine Gene Expression. *Endocrinology*, *153*(6), 2823–2830. <https://doi.org/10.1210/en.2011-2161>
- Maury, E., Ehala-Aleksejev, K., Guiot, Y., Detry, R., Vandenhooft, A., & Brichard, S. M. (2007). Adipokines oversecreted by omental adipose tissue in human obesity. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *293*(3), E656–E665. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00127.2007>
- McCurdy, C. E., Bishop, J. M., Williams, S. M., Grayson, B. E., Smith, M. S., Friedman, J. E., & Grove, K. L. (2009). Maternal high-fat diet triggers lipotoxicity in the fetal livers of nonhuman primates. *Journal of Clinical Investigation*, *119*(2), 323–335. <https://doi.org/10.1172/JCI32661>
- Meehan, S., Beck, C. R., Mair-Jenkins, J., Leonardi-Bee, J., & Puleston, R. (2014). Maternal Obesity and Infant Mortality: A Meta-Analysis. *Pediatrics*, *133*(5), 863–871. <https://doi.org/10.1542/peds.2013-1480>
- Molyneux, R. J., Lee, S. T., Gardner, D. R., Panter, K. E., & James, L. F. (2007). Phytochemicals: The good, the bad and the ugly? *Phytochemistry*, *68*(22–24), 2973–2985. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.09.004>
- Moody, A. (2014). Health survey for England 2013: adult anthropometric measures,

overweight and obesity. *Health and Social Care Information Service*. Retrieved from <http://content.digital.nhs.uk/catalogue/PUB16076/HSE2013-Ch10-Adult-anth-meas.pdf>

- Moraga M., F., Rebollo G., M. J., Bórquez V., P., Cáceres D., J., & Castillo D., C. (2003). Tratamiento de la obesidad infantil: Factores pronósticos asociados a una respuesta favorable. *Revista Chilena de Pediatría*, *74*(4), 374–380. <https://doi.org/10.4067/S0370-41062003000400004>
- Moran, C. J., Ramesh, A., Brama, P. A. J., O'Byrne, J. M., O'Brien, F. J., & Levingstone, T. J. (2016). The benefits and limitations of animal models for translational research in cartilage repair. *Journal of Experimental Orthopaedics*, *3*(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s40634-015-0037-x>
- Mukai, Y., Sun, Y., & Sato, S. (2013). Azuki bean polyphenols intake during lactation upregulate AMPK in male rat offspring exposed to fetal malnutrition. *Nutrition*, *29*(1), 291–297. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2012.06.005>
- Mulvihill, E. E., Allister, E. M., Sutherland, B. G., Telford, D. E., Sawyez, C. G., Edwards, J. Y., ... Huff, M. W. (2009). Naringenin Prevents Dyslipidemia, Apolipoprotein B Overproduction, and Hyperinsulinemia in LDL Receptor-Null Mice With Diet-Induced Insulin Resistance. *Diabetes*, *58*(10), 2198–2210. <https://doi.org/10.2337/db09-0634>
- Nagy, C., & Turecki, G. (2015). Transgenerational epigenetic inheritance: an open discussion. *Epigenomics*, *7*(5), 781–790. <https://doi.org/10.2217/epi.15.46>
- Nathanielsz, P. W., Poston, L., & Taylor, P. D. (2007). In Utero Exposure to Maternal Obesity and Diabetes: Animal Models That Identify and Characterize Implications for Future Health. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, *34*(2), 201–212. <https://doi.org/10.1016/j.ogc.2007.03.006>
- Neeha, V. S., & Kinth, P. (2013). Nutrigenomics research: a review. *Journal of Food Science and Technology*, *50*(3), 415–428. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0775-z>
- Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., & Graetz, N. (2014). Global, regional and national prevalence of overweight and obesity in children and adults 1980-2013: A systematic analysis. *Lancet*, *384*(9945), 766–781. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60460-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60460-8).Global
- Nuttall, F. Q. (2015). Body Mass Index: Obesity, BMI, and Health: A Critical Review. *Nutrition Today*, *50*(3), 117–128. <https://doi.org/10.1097/NT.0000000000000092>
- Oliveira, T. W. S., Leandro, C. G., de Jesus Deiró, T. C. B., dos Santos Perez, G., da França Silva, D., Druzian, J. I., ... Barreto-Medeiros, J. M. (2011). A Perinatal Palatable High-Fat Diet Increases Food Intake and Promotes Hypercholesterolemia in Adult Rats. *Lipids*, *46*(11), 1071–1074. <https://doi.org/10.1007/s11745-011-3604-7>
- Organización Mundial de la Salud. (2013). PROYECTO REVISADO Y ACTUALIZADO.
- Oster, M., Nuchchanart, W., Trakooljul, N., Muráni, E., Zeyner, A., Wirthgen, E., ...

- Wimmers, K. (2016). Methylating micronutrient supplementation during pregnancy influences foetal hepatic gene expression and IGF signalling and increases foetal weight. *European Journal of Nutrition*, *55*(4), 1717–1727. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-0990-2>
- Ouhtit, A. (2014). Nutrigenomics: From promise to practice. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, *14*(1), e1-3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24516738>
- Palou, A., & Picó, C. (2009). Leptin intake during lactation prevents obesity and affects food intake and food preferences in later life. *Appetite*, *52*(1), 249–252. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2008.09.013>
- Pan, M. H., Lai, C. S., & Ho, C. T. (2010). Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food & Function*, *1*(1), 15–31. <https://doi.org/10.1039/c0fo00103a>
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, *5*, e47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2*(5), 270–278. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>
- Parks, B. W., Nam, E., Org, E., Kostem, E., Norheim, F., Hui, S. T., ... Lusic, A. J. (2013). Genetic Control of Obesity and Gut Microbiota Composition in Response to High-Fat, High-Sucrose Diet in Mice. *Cell Metab. January*, *8*(171), 141–152. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.12.007>
- Parlee, S. D., & MacDougald, O. A. (2014). Maternal nutrition and risk of obesity in offspring: the Trojan horse of developmental plasticity. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1842*(3), 495–506. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.07.007>
- Pavlidis, C., Patrinos, G. P., & Katsila, T. (2015). Nutrigenomics: A controversy. *Applied and Translational Genomics*, *4*, 50–53. <https://doi.org/10.1016/j.atg.2015.02.003>
- Peña-Romero, A. C., Navas-Carrillo, D., Marín, F., & Orenes-Piñero, E. (2017). The future of nutrition: Nutrigenomics and nutrigenetics in obesity and cardiovascular diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–12. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1349731>
- Perrone, S., Luisa, M., Antonino, T., Carlotta, S., Riccitelli, M., Gabriella, M., ... Neonatologia, I. (2016). Fetal Programming , Maternal Nutrition , and Oxidative Stress Hypothesis. *Journal of Pediatric Biochemistry*, 96–102. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1593811>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, *29*(9), e45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11328886>
- Phillips, C. (2013). Nutrigenetics and Metabolic Disease: Current Status and Implications for Personalised Nutrition. *Nutrients*, *5*(1), 32–57. <https://doi.org/10.3390/nu5010032>
- Poston, L., Caleyachetty, R., Cnattingius, S., Corvalán, C., Uauy, R., Herring, S., &

- Gillman, M. W. (2016). Preconceptional and maternal obesity: epidemiology and health consequences. *THE LANCET Diabetes & Endocrinology*, 8587(16). [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(16\)30217-0](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(16)30217-0)
- Prasain, J. K., & Barnes, S. (2007). Metabolism and Bioavailability of Flavonoids in Chemoprevention: Current Analytical Strategies and Future Prospectus. *Molecular Pharmaceutics*, 4(6), 846–864. <https://doi.org/10.1021/mp700116u>
- Prip-Buus, C., Perdereau, D., Foufelle, F., Maury, J., Ferré, P., & Girard, J. (1995). Induction of Fatty-Acid-Synthase Gene Expression by Glucose in Primary Culture of Rat Hepatocytes: Dependency upon Glucokinase Activity. *European Journal of Biochemistry*, 230(1), 309–315. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.0309i.x>
- Priscilla, D. H., Roy, D., Suresh, A., Kumar, V., & Thirumurugan, K. (2014). Naringenin inhibits α -glucosidase activity: A promising strategy for the regulation of postprandial hyperglycemia in high fat diet fed streptozotocin induced diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*, 210, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.12.014>
- Pu, P., Gao, D.-M., Mohamed, S., Chen, J., Zhang, J., Zhou, X.-Y., ... Jiang, H. (2012). Naringin ameliorates metabolic syndrome by activating AMP-activated protein kinase in mice fed a high-fat diet. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 518(1), 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.11.026>
- Purcell, R. H., Sun, B., Pass, L. L., Power, M. L., Moran, T. H., & Tamashiro, K. L. K. (2011). Maternal stress and high-fat diet effect on maternal behavior, milk composition, and pup ingestive behavior. *Physiology & Behavior*, 104(3), 474–479. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.05.012>
- Raimondo, A., Rees, M. G., & Gloyn, A. L. (2015). Glucokinase regulatory protein: complexity at the crossroads of triglyceride and glucose metabolism. *Current Opinion in Lipidology*, 26(2), 88–95. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000155>
- Rana, S., Kumar, S., Rathore, N., Padwad, Y., & Bhushana, S. (2016). Nutrigenomics and its Impact on Life Style Associated Metabolic Diseases. *Current Genomics*, 17(3), 261–278. <https://doi.org/10.2174/1389202917666160202220422>
- Redan, B. W., Buhman, K. K., Novotny, J. A., & Ferruzzi, M. G. (2016). Altered Transport and Metabolism of Phenolic Compounds in Obesity and Diabetes : Implications for Functional Food Development and Assessment 1 , 2, (12). <https://doi.org/10.3945/an.116.013029.1090>
- Ribaroff, G. A., Wastnedge, E., Drake, A. J., Sharpe, R. M., & Chambers, T. J. G. (2017). Animal models of maternal high fat diet exposure and effects on metabolism in offspring: a meta-regression analysis. *Obesity Reviews*, 18(6), 673–686. <https://doi.org/10.1111/obr.12524>
- Rkhzay-Jaf, J., O'Dowd, J. F., & Stocker, C. J. (2012). Maternal Obesity and the Fetal Origins of the Metabolic Syndrome. *Current Cardiovascular Risk Reports*, 6(5), 487–495. <https://doi.org/10.1007/s12170-012-0257-x>
- Rtveladze, K., Marsh, T., Barquera, S., Sanchez Romero, L. M., Levy, D., Melendez,

- G., ... Medina, C. (2013). Obesity prevalence in Mexico: impact on health and economic burden. *Public Health Nutr*, 17(1), 233–239. <https://doi.org/10.1017/S1368980013000086>
- Ruager-Martin, R., Hyde, M. J., & Modi, N. (2010). Maternal obesity and infant outcomes. *Early Human Development*, 86(11), 715–722. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2010.08.007>
- Ruchat, S. M., Hivert, M. F., & Bouchard, L. (2013). Epigenetic programming of obesity and diabetes by in utero exposure to gestational diabetes mellitus. *Nutrition Reviews*, 71(SUPPL1). <https://doi.org/10.1111/nure.12057>
- Sachithanandan, N., Fam, B. C., Fynch, S., Dzamko, N., Watt, M. J., Wormald, S., ... Steinberg, G. R. (2010). Liver-specific suppressor of cytokine signaling-3 deletion in mice enhances hepatic insulin sensitivity and lipogenesis resulting in fatty liver and obesity. *Hepatology*, 52(5), 1632–1642. <https://doi.org/10.1002/hep.23861>
- Sales, N. M. R., Pelegrini, P. B., & Goersch, M. C. (2014a). Nutrigenomics: definitions and advances of this new science. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2014, 202759. <https://doi.org/10.1155/2014/202759>
- Sales, N. M. R., Pelegrini, P. B., & Goersch, M. C. (2014b). Nutrigenomics: Definitions and advances of this new science. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/202759>
- Sampey, B. P., Vanhoose, A. M., Winfield, H. M., Freemerman, A. J., Muehlbauer, M. J., Fueger, P. T., ... Makowski, L. (2011). Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 19(6), 1109–1117. <https://doi.org/10.1038/oby.2011.18>
- Samuelsson, A.-M., Matthews, P. A., Argenton, M., Christie, M. R., McConnell, J. M., Jansen, E. H. J. M., ... Taylor, P. D. (2008). Diet-Induced Obesity in Female Mice Leads to Offspring Hyperphagia, Adiposity, Hypertension, and Insulin Resistance: A Novel Murine Model of Developmental Programming. *Hypertension*, 51(2), 383–392. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.101477>
- Santangelo, C., Vari, R., Scazzocchio, B., Filesi, C., & Masella, R. (2014). Management of reproduction and pregnancy complications in maternal obesity: Which role for dietary polyphenols? *BioFactors*, 40(1), 79–102. <https://doi.org/10.1002/biof.1126>
- SANTOS, C. D. S., BALBO, S. L., GUIMARÃES, A. T. B., SAGAE, S. C., NEGRETTI, F., & GRASSIOLLI, S. (2017). Life-long Maternal Cafeteria Diet Promotes Tissue-Specific Morphological Changes in Male Offspring Adult Rats. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 89(4), 2887–2900. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720170316>
- Sclafani, A. (2001). Post-ingestive positive controls of ingestive behavior. *Appetite*, 36(1), 79–83. <https://doi.org/10.1006/appe.2000.0370>
- Sharkey, F. H., Banat, I. M., & Marchant, R. (2004). Detection and quantification of gene expression in environmental bacteriology. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 3795–3806. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.3795->

3806.2004

- Shen, C.-L., Cao, J. J., Dagda, R. Y., Chanjaplammoitol, S., Lu, C., Chyu, M.-C., ... Yeh, J. K. (2012). Green tea polyphenols benefits body composition and improves bone quality in long-term high-fat diet-induced obese rats. *Nutrition Research*, 32(6), 448–457. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2012.05.001>
- Simmons, R. A. (2007). Developmental origins of diabetes: The role of epigenetic mechanisms. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 14(1), 13–16. <https://doi.org/10.1097/MED.0b013e328013da5b>
- Soares, T. S., Andreolla, A. P., Miranda, C. A., Klöppel, E., Rodrigues, L. S., Moraes-Souza, R. Q., ... Campos, K. E. (2018). Effect of the induction of transgenerational obesity on maternal-fetal parameters. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 64(1), 51–59. <https://doi.org/10.1080/19396368.2017.1410866>
- Srinivasan, M., Katewa, S. D., Palaniyappan, A., Pandya, J. D., & Patel, M. S. (2006). Maternal high-fat diet consumption results in fetal malprogramming predisposing to the onset of metabolic syndrome-like phenotype in adulthood. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 291(4), E792–E799. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00078.2006>
- Strakovsky, R. S., Zhang, X., Zhou, D., & Pan, Y.-X. (2011). Gestational high fat diet programs hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and histone modification in neonatal offspring rats. *The Journal of Physiology*, 589(11), 2707–2717. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.203950>
- Sullivan, E. L., Nousen, E. K., & Chamblou, K. A. (2014). Maternal high fat diet consumption during the perinatal period programs offspring behavior. *Physiology & Behavior*, 123, 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.07.014>
- Sun, B., Purcell, R. H., Terrillion, C. E., Yan, J., Moran, T. H., & Tamashiro, K. L. K. (2012). Maternal high-fat diet during gestation or suckling differentially affects offspring leptin sensitivity and obesity. *Diabetes*, 61(11), 2833–2841. <https://doi.org/10.2337/db11-0957>
- Tanaka, M., Kita, T., Yamasaki, S., Kawahara, T., Ueno, Y., Yamada, M., ... Saito, T. (2017). Maternal resveratrol intake during lactation attenuates hepatic triglyceride and fatty acid synthesis in adult male rat offspring. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 9, 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.12.011>
- Tenenbaum-Gavish, K., & Hod, M. (2013). Impact of maternal obesity on fetal health. *Fetal Diagnosis and Therapy*, 34(1), 1–7. <https://doi.org/10.1159/000350170>
- Torisu, T., Sato, N., Yoshiga, D., Kobayashi, T., Yoshioka, T., Mori, H., ... Yoshimura, A. (2007). The dual function of hepatic SOCS3 in insulin resistance in vivo. *Genes to Cells*, 12(2), 143–154. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2007.01044.x>
- Ueda, M., & Ashida, H. (2012). Green Tea Prevents Obesity by Increasing Expression of Insulin-like Growth Factor Binding Protein-1 in Adipose Tissue of High-Fat Diet-Fed Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 8917–8923. <https://doi.org/10.1021/jf2053788>

- Ueki, K., Kondo, T., Tseng, Y.-H., & Kahn, C. R. (2004). Central role of suppressors of cytokine signaling proteins in hepatic steatosis, insulin resistance, and the metabolic syndrome in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(28), 10422–10427. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402511101>
- Verma, S., & Hussain, M. E. (2016). Obesity and diabetes: An update. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, *11*(1), 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2016.06.017>
- Vinayagam, R., & Xu, B. (2015). Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review. *Nutrition & Metabolism*, *12*(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12986-015-0057-7>
- Vithayathil, M. A., Gugusheff, J. R., Ong, Z. Y., Langley-Evans, S. C., Gibson, R. A., & Muhlhauser, B. S. (2018). Exposure to maternal cafeteria diets during the suckling period has greater effects on fat deposition and Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c (SREBP-1c) gene expression in rodent offspring compared to exposure before birth. *Nutrition & Metabolism*, *15*, 17. <https://doi.org/10.1186/s12986-018-0253-3>
- Vomelová, I., Vanícková, Z., & Sedo, A. (2009). Methods of RNA purification. All ways (should) lead to Rome. *Folia Biologica*, *55*(6), 243–251. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20163774>
- Wakil, S. J., & Abu-Elheiga, L. A. (2009). Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. *Journal of Lipid Research*, *50*(Supplement), S138–S143. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800079-JLR200>
- Wang, D., & Dubois, R. N. (2012). Associations between obesity and cancer: the role of fatty acid synthase. *Journal of the National Cancer Institute*, *104*(5), 343–345. <https://doi.org/10.1093/jnci/djs010>
- Wang, J., Wu, Z., Li, D., Li, N., Dindot, S. V., Satterfield, M. C., ... Wu, G. (2012). Nutrition, epigenetics, and metabolic syndrome. *Antioxidants & Redox Signaling*, *17*(2), 282–301. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4381>
- Warden, C. H., & Fislér, J. S. (2008). Comparisons of diets used in animal models of high-fat feeding. *Cell Metabolism*, *7*(4), 277. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.03.014>
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*, *112*(12), 1796–1808. <https://doi.org/10.1172/JCI19246>
- Westerterp-Plantega, M. (2004). Effects of energy density of daily food intake on long-term energy intake. *Physiology & Behavior*, *81*(5), 765–771. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.04.030>
- WHO | Obesity and overweight. (2016). *WHO*.
- Wiejak, J., Dunlop, J., Mackay, S. P., & Yarwood, S. J. (2013). Flavonoids induce expression of the suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3) gene and suppress

- IL-6-activated signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) activation in vascular endothelial cells. *The Biochemical Journal*, 454(2), 283–293.
<https://doi.org/10.1042/BJ20130481>
- Williams, C. B., Mackenzie, K. C., & Gahagan, S. (2014). The effect of maternal obesity on the offspring. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 57(3), 508–515.
<https://doi.org/10.1097/GRF.0000000000000043>
- Willyard, C. (2014). Heritability: The family roots of obesity. *Nature*, 508(7496), S58-60.
<https://doi.org/10.1038/508S58a>
- Wittwer, C. (2001). Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications. In *Rapid Cycle Real-Time PCR* (pp. 1–8). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-59524-0_1
- Wolfram, S., Raederstorff, D., Preller, M., Wang, Y., Teixeira, S. R., Riegger, C., & Weber, P. (2006). Epigallocatechin Gallate Supplementation Alleviates Diabetes in Rodents. *The Journal of Nutrition*, 136(10), 2512–2518.
<https://doi.org/10.1093/jn/136.10.2512>
- Won, S. B., Han, A., & Kwon, Y. H. (2017). Maternal consumption of low-isoflavone soy protein isolate alters hepatic gene expression and liver development in rat offspring. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 42, 51–61.
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.12.013>
- World Obesity Federation. (2015). World Obesity Federation. Retrieved February 13, 2017, from <http://www.worldobesity.org/resources/world-map-obesity/>
- Wozniak, S. E., Gee, L. L., Wachtel, M. S., & Frezza, E. E. (2009). Adipose Tissue: The New Endocrine Organ? A Review Article. *Digestive Diseases and Sciences*, 54(9), 1847–1856. <https://doi.org/10.1007/s10620-008-0585-3>
- Wunderlich, C. M., Hövelmeyer, N., & Wunderlich, F. T. (2013). Mechanisms of chronic JAK-STAT3-SOCS3 signaling in obesity. *JAK-STAT*, 2(2), e23878.
<https://doi.org/10.4161/jkst.23878>
- Xu, H., Wu, Z., & Xu, Y. (2014). [Effects of quercetin in pregnant and lactation period on weight and expression of insulin-like growth factors-1 mRNA of obese female rats offspring]. *Beijing Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ban = Journal of Peking University. Health Sciences*, 46(3), 347–354. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24943009>
- Yang, D., Huynh, H., & Wan, Y. (2017). Milk lipid regulation at the maternal-offspring interface. *Seminars in Cell & Developmental Biology*.
<https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.10.012>
- Yeomans, M. R., Blundell, J. E., & Leshem, M. (2004). Palatability: response to nutritional need or need-free stimulation of appetite? *The British Journal of Nutrition*, 92 Suppl 1, S3-14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15384315>
- Yoshida, H., Watanabe, W., Oomagari, H., Tsuruta, E., Shida, M., & Kurokawa, M. (2013). Citrus flavonoid naringenin inhibits TLR2 expression in adipocytes. *The*

Journal of Nutritional Biochemistry, 24(7), 1276–1284.
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.10.003>

- Yu, R., Kim, C.-S., Kwon, B.-S., & Kawada, T. (2006). Mesenteric Adipose Tissue-Derived Monocyte Chemoattractant Protein-1 Plays a Crucial Role in Adipose Tissue Macrophage Migration and Activation in Obese Mice*. *Obesity*, 14(8), 1353–1362. <https://doi.org/10.1038/oby.2006.153>
- Zamora-Ros, R., Andres-Lacueva, C., Lamuela-Raventós, R. M., Berenguer, T., Jakszyn, P., Barricarte, A., ... González, C. A. (2010). Estimation of Dietary Sources and Flavonoid Intake in a Spanish Adult Population (EPIC-Spain). *Journal of the AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION*, 110(3), 390–398. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2009.11.024>
- Zanatta, L., Rosso, A., Folador, P., Figueiredo, M. S. R. B., Pizzolatti, M. G., Leite, L. D., & Silva, F. R. M. B. (2008). Insulinomimetic effect of kaempferol 3-neohesperidoside on the rat soleus muscle. *Journal of Natural Products*, 71(4), 532–535. <https://doi.org/10.1021/np070358+>
- Zang, Y., Zhang, L., Igarashi, K., & Yu, C. (2015). The anti-obesity and anti-diabetic effects of kaempferol glycosides from unripe soybean leaves in high-fat-diet mice. *Food & Function*, 6(3), 834–841. <https://doi.org/10.1039/c4fo00844h>
- Zhang, N. (2015). Epigenetic modulation of DNA methylation by nutrition and its mechanisms in animals. *Animal Nutrition (Zhongguo Xu Mu Shou Yi Xue Hui)*, 1(3), 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2015.09.002>
- Zhang, Y., Liu, J., Yao, J., Ji, G., Qian, L., Wang, J., ... Liu, Y. (2014). Obesity: pathophysiology and intervention. *Nutrients*, 6(11), 5153–5183. <https://doi.org/10.3390/nu6115153>
- Zou, T., Chen, D., Yang, Q., Wang, B., Zhu, M.-J., Nathanielsz, P. W., & Du, M. (2017). Resveratrol supplementation of high-fat diet-fed pregnant mice promotes brown and beige adipocyte development and prevents obesity in male offspring. *The Journal of Physiology*, 595(5), 1547–1562. <https://doi.org/10.1113/JP273478>
- Zygmunt, K., Faubert, B., MacNeil, J., & Tsiani, E. (2010). Naringenin, a citrus flavonoid, increases muscle cell glucose uptake via AMPK. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 398(2), 178–183. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.06.048>