



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**Intervención Nutricional en la Obesidad
Materna de la Rata: Beneficios en la
Conducta y Aprendizaje de la Progenie**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

RAMÍREZ RODRÍGUEZ ADRIANA

MÉXICO, D.F.

2013

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DR. JOSÉ LUIS A. MORA GUEVARA
VOCAL: DRA. ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ
SECRETARIO: Q. F. B. ENRIQUE ESCALERA ZÚÑIGA
1er. SUPLENTE: DR. ARTURO VALLE MENDIOLA
2° SUPLENTE: DRA. JUANA ROSADO PÉREZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ), Departamento de Biología de la Reproducción.

DIRECTORA DE TEMA:

Dra. Elena Zambrano González

ASESOR DE TEMA:

Q. F. B. Enrique Escalera Zúñiga

SUSTENTANTE

Adriana Ramírez Rodríguez

Agradecimientos

A mis padres Angélico Ramírez Cruz y Flor Rodríguez Rivera por todo su apoyo, paciencia y la oportunidad de darme una carrera universitaria, así como fortaleza y sabiduría.

A mi hermano Miguel Ángel Ramírez Rodríguez por su ayuda, apoyo y afecto.

A la Dra Elena Zambrano González por las facilidades otorgadas a la realización en esta tesis, así como su confianza, paciencia y dedicación; al igual que a todo su equipo de trabajo Luis Reyes, Lupita Rodríguez, Claudia Vega, Carlos, Mariana, Marisela, Margarita y Omar.

Índice

ÍNDICE	4
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	8
MARCO TEÓRICO	9
OBESIDAD	9
EMBARAZO Y OBESIDAD	10
NUTRICIÓN EN LA GESTACIÓN Y LACTANCIA	11
ORÍGENES DEL DESARROLLO DE LA SALUD Y LA ENFERMEDAD	13
ESTRÉS MATERNO	14
ANSIEDAD RELACIONADA CON LA CONDUCTA	17
EFFECTOS DEL APRENDIZAJE Y LA MOTIVACIÓN	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
HIPÓTESIS	22
OBJETIVOS	23
DISEÑO EXPERIMENTAL	24
CRITERIOS	25
VARIABLES	25
MATERIAL Y MÉTODOS	27
ANIMALES EXPERIMENTALES	27
MADRES	27
DIETAS	28
MEDICIÓN DE PESO CORPORAL E INGESTA	31
APAREAMIENTO Y DETERMINACIÓN DE LA PREÑEZ	31
CRÍAS. MEDIDAS AL NACIMIENTO	32
PRUEBAS CONDUCTUALES	32

Laberinto Elevado en Cruz (LEC)	33
Campo Abierto	34
Condicionamiento Operante y Prueba de Razón Progresiva	35
<i>Procedimiento de las pruebas conductuales</i>	36
CONSUMO LIBRE DE SACAROSA	37
MEDICIONES DE CORTICOSTERONA	38
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	39
 RESULTADOS	 <u>41</u>
 MADRES EXPERIMENTALES	 41
PARÁMETROS OBTENIDOS ANTES DE LA GESTACIÓN	41
Peso Corporal	41
Ingesta de alimento	42
PARÁMETROS MATERNOS DURANTE LA GESTACIÓN Y LACTANCIA	43
Ingesta de Alimento	43
Peso Corporal	44
Corticosterona Materna	45
CRÍAS EXPERIMENTALES	47
PARÁMETROS OBTENIDOS EN LAS CRÍAS AL DESTETE (21 DÍAS DE LACTANCIA)	47
Peso Corporal y Talla al Nacimiento	47
Peso Corporal Durante la Lactancia	47
PARÁMETROS OBTENIDOS DESPUÉS DEL DESTETE (21 DÍAS DE EDAD)	49
Peso Corporal de los 21 a 72 días de edad	49
PARÁMETROS A LOS 70 DÍAS DE EDAD	50
Ingesta y Peso Corporal	50
PARÁMETROS A PARTIR DE LOS 75 DÍAS DE EDAD. PRUEBAS CONDUCTUALES	51
Laberinto Elevado en Cruz (LEC)	51
Prueba de Campo Abierto	53
Condicionamiento Operante y prueba de Razón Progresiva	55
Consumo Libre de Sacarosa	57
Mediciones de Corticosterona	57
 DISCUSIÓN	 <u>58</u>
 CONCLUSIONES	 <u>62</u>
 BIBLIOGRAFÍA	 <u>63</u>

Resumen

La obesidad y el sobrepeso han alcanzado cifras alarmantes que incluyen a mujeres en edad reproductiva tanto en países altamente industrializados como en vías de desarrollo. Estudios realizados en animales de experimentación han demostrado que la nutrición de la madre durante el embarazo y/o lactancia afecta la estructura y función del cerebro. Sin embargo, poco se sabe sobre las consecuencias de la obesidad materna y de la intervención nutricional sobre la conducta y el aprendizaje en las crías provenientes de madres obesas. Por lo que el presente trabajo propuso investigar en un modelo experimental con ratas Wistar los efectos de la obesidad materna y la intervención nutricional antes y durante la gestación sobre el comportamiento relacionado con la ansiedad.

Se emplearon ratas hembras de la cepa Wistar recién destetadas de 21 días (d) de edad las cuales fueron asignadas en cuatro grupos experimentales de acuerdo a su patrón de alimentación, teniendo al grupo Control (C) alimentado con dieta estándar para roedor (comercial de 4 Kcal/g); el grupo de Obesidad Materna (OM) alimentado con dieta alta en grasa (preparada en el laboratorio de 5 Kcal/g); el grupo de Intervención Nutricional Previa a la Gestación (IPG) en el cual las madres fueron alimentadas con dieta alta en grasa desde el destete hasta los 90 d y a partir de ese momento consumieron únicamente dieta control y el grupo de intervención nutricional durante la gestación (IG) en el cual las madres fueron alimentadas con dieta alta en grasa desde el destete, al inicio y durante la gestación y lactancia ratas fueron alimentadas exclusivamente con dieta control. Todas ratas fueron apareadas a los 120 días con un macho sano no experimental de la misma cepa. Una vez que nacieron las crías, se asignaron al mismo grupo de la madre. A partir del destete, todas las crías fueron alimentadas con dieta control hasta el final del experimento.

Se determinó ingesta y peso corporal de las madres experimentales antes y durante gestación, así como en lactancia, donde el grupo OM mostró mayor ganancia de peso con respecto a los demás grupos experimentales IPG e IG y en particular con el grupo control C. En las crías, durante el periodo de lactancia el peso corporal fue mayor en el grupo de OM, sin embargo, después del destete no se vieron diferencias entre grupos, en el peso ni en la ingesta de alimento. A los 19 d de gestación las concentraciones de corticosterona en el suero de madres del

grupo de OM se elevaron. A los 75 d las crías se sometieron a las pruebas de Laberinto Elevado en Cruz (LEC) y la prueba de Campo Abierto (CA) con el fin de evaluar la ansiedad y la conducta exploratoria, donde se observó que la dieta hipercálica no afecta la ansiedad, sin embargo; las crías provenientes de madres del grupo IG son más exploratorias. Posteriormente a estas mismas ratas se les evaluó el aprendizaje por medio de la “Caja de Skinner” mediante la prueba de Condicionamiento Operante y Prueba de razón Progresiva, se observó que las crías de madres OM requieren de un mayor número de sesiones para alcanzar los criterios establecidos de dichas pruebas, en cambio la motivación no se ve afectada. Por lo tanto, la dieta alta en grasa tuvo un impacto en el aprendizaje de las crías machos, sin que perjudique la motivación, ni se observe elevación de la ansiedad; gracias a la intervención nutricional previene los daños en el aprendizaje sin presentar una recuperación, motivo por el cual es importante optimizar la dieta de las mujeres en edad reproductiva.

Introducción

El sobrepeso y la obesidad tanto en países altamente industrializados como en vías de desarrollo han alcanzado cifras alarmantes que incluyen a mujeres obesas en edad reproductiva. En México el 70.5% de las mujeres en edad reproductiva sufren sobrepeso y obesidad¹. Tras la concepción, estas mujeres convertidas en madres obesas se caracterizan por tener comprometida su salud y la del producto, en especial a largo plazo, mediante una predisposición a enfermedades metabólicas en la edad adulta, las alteraciones nutricionales de un individuo durante periodos críticos del desarrollo como la gestación y lactancia pueden modificar su fisiología y metabolismo, al igual que se compromete el desarrollo del cerebro de las crías ya que la dieta perinatal ejerce influencia importante, lo cual puede repercutir en el aprendizaje y la conducta afectiva. Dada esta situación, es necesario tomar medidas sobre la alimentación de las mujeres en edad reproductiva que permitan prevenir los efectos adversos originados por la obesidad materna. Recientemente en nuestro equipo de trabajo se ha demostrado que la intervención nutricional previo y durante la gestación, en la obesidad materna, previene de manera importante algunos de los efectos adversos en las crías, sin embargo, no se tienen registros de estos beneficios a nivel conductual y de aprendizaje, motivo por el cual en el presente trabajo se propone su estudio en un modelo experimental con ratas Wistar con el fin de conocer si existen dichos efectos benéficos.

Marco teórico

Obesidad

El sobrepeso y la obesidad se definen como la acumulación anormal y excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud, siendo un elemento de diagnóstico sencillo y aceptado el Índice de Masa Corporal (IMC) Ec. 1, así un valor ≥ 25.00 determina la presencia de sobrepeso y uno ≥ 30.00 de obesidad para ambos sexos independientemente de la edad².

Ec. 1.

$$IMC = \frac{Peso(Kg)}{[Estatura(m)]^2}$$

El IMC o Índice de Quetelet es el valor obtenido de dividir el peso corporal en Kg entre el cuadrado de la estatura en m².

La nutrición a lo largo de la vida es una de las principales determinantes de la salud, desempeño físico y mental. La mala nutrición (tanto desnutrición como exceso en la ingesta) tiene causas complejas que involucran determinantes biológicos, socioeconómicos y culturales. Un desequilibrio entre la ingesta y gasto energético resulta en el sobrepeso o la obesidad. La causa de este desequilibrio es frecuentemente la ingestión de dietas con alta densidad energética y de bebidas azucaradas en combinación con una escasa actividad física, originando la predisposición de las personas que la padecen a una gran cantidad de padecimientos³ como son los cardiovasculares, diabetes, trastornos del aparato locomotor (como osteoartritis) y algunos cánceres², desafortunadamente se ha observado que ésta predisposición también se puede “transmitir” en la descendencia de las madres obesas³.

El tejido adiposo, es el principal responsable del almacenamiento de la energía en forma de triacilglicéridos, y en la obesidad sufre diversas modificaciones. Independientemente del incremento de su masa se presentan alteraciones

histológicas, neurales y vasculares relacionadas al metabolismo de lípidos y su función endócrina. Sin perder de vista la acumulación de grasa en el hígado y músculo esquelético y sus respectivas consecuencias^{4,5}.

Dentro del sistema nervioso central, el hipotálamo es el centro primario para la regulación de la conducta alimentaria y metabolismo energético. El apetito responde a la regulación que depende principalmente de la interacción de dos de sus áreas: “el centro del hambre” ubicado en el núcleo lateral y el “centro de saciedad” en el núcleo ventromedial. Así, al estimular el centro del hambre se induce la ingesta de alimentos en animales experimentales y su destrucción causa anorexia grave. Mientras que la estimulación en el cerebro de la saciedad produce el cese de la ingesta y una lesión produce hiperfagia y el síndrome de obesidad hipotalámica, siempre y cuando el suministro de alimento sea abundante^{6, 7, 8}.

Los núcleos hipotalámicos reciben señales positivas y negativas relacionadas a la ingesta y gasto energético, en los cuales la leptina e insulina son las hormonas principales por su efecto catabólico o anabólico que al ser percibidas en el hipotálamo en estas áreas activan los mecanismos centrales de regulación². Igualmente se tienen registros de que la ghrelina, un péptido que se sintetiza en el estómago, tiene efectos orexinérgicos aumentando la ingestión de alimentos y disminuye al elevarse los niveles de colecistocinina un péptido inductor de la saciedad junto con un lípido la oleiletanolamida^{9, 10}.

Embarazo y obesidad

La obesidad representa una epidemia cada vez mayor en los países desarrollados y en desarrollo que también involucra las mujeres en edad reproductiva.¹¹ De acuerdo a la OMS se tienen registros del año 2008 con 1500 millones de personas

adultas de más de 20 años de edad padeciendo sobrepeso, de las cuales mas de 200 millones son hombres y cerca de 300 millones mujeres con obesidad².

La obesidad en mujeres en edad reproductiva disminuye la tasa de fertilidad y durante la gestación, implica un alto riesgo de presentar diversas patologías como defectos congénitos en la descendencia, mayor probabilidad de diabetes gestacional, hipertensión inducida por el embarazo (preclampsia), mayor riesgo de aborto espontáneo en la segunda mitad del embarazo y se ha demostrado mayor mortalidad perinatal vinculada al exceso del peso materno¹²; además influye negativamente en la mortalidad materna, fetal y el fenotipo de la descendencia de por vida, incluidos los efectos no deseados en el desarrollo del cerebro, la conducta, el afecto y la cognición de las crías^{13, 14}.

El desarrollo de obesidad infantil puede ser resultado, no sólo de las condiciones de sedentarismo, estilos de vida y alimentación, sino también de las condiciones nutricionales y metabólicas de la madre. En México se tienen registros de que la prevalencia de sobrepeso y obesidad combinada fue del 26.9% para ambos sexos en 1999, de 34.8% en el año 2006 y de 34.4% en 2012. Esto se debe a que el desarrollo de obesidad materna durante la gestación y la lactancia, es una condición de estrés que predispone al feto en crecimiento al desarrollo de enfermedades metabólicas desde la niñez y en mayor grado, en la vida adulta^{1, 15, 16}.

Nutrición en la gestación y lactancia

Desde el inicio del embarazo el cuerpo materno almacena nutrientes que serán usados en los meses posteriores de la gestación, el crecimiento del feto asume prioridad sobre varios elementos nutricionales del cuerpo materno y las porciones

del feto continuará creciendo aun cuando la madre relativamente no consuma una dieta lo suficientemente nutritiva¹⁷.

Se sabe que la mayor función de la placenta es permitir la difusión de nutrientes desde la circulación materna a la circulación fetal, también productos de excreción desde el feto de regreso a la madre. En los primeros meses del desarrollo, la permeabilidad de la placenta es reducida respecto a posteriores etapas del embarazo, debido a que la membrana vellosa aún no ha alcanzado su grosor mínimo; conforme la placenta crece, la permeabilidad aumenta hasta el final del embarazo^{17, 18}.

La leche materna es el mejor alimento para los recién nacidos. La leche materna es isotónica respecto al medio intracelular, su contenido de agua permite la suspensión y solubilización de azúcares, proteínas, sodio, potasio, citrato, magnesio, calcio, cloruro y vitaminas solubles. En las ratas la lactancia dura alrededor de tres semanas, este proceso induce la movilización de las reservas maternas y un gran aumento de la ingesta de alimento dependiente del tamaño la camada lactante^{19, 20}. Por lo que respecta a ratas lactantes alimentadas con dietas altas en grasa, se ha reportado que se producen cantidades mayores con un contenido elevado de lípidos respecto a ratas con alimentación baja en grasa²². En humanos el perfil de ácidos grasos de la leche materna, pero no el contenido de grasa, varía de acuerdo con la dieta de la madre²³. Cuando se consumen dietas ricas en grasas poliinsaturadas, se encuentran más ácidos grasos poliinsaturados en la leche. Cuando se consumen dietas muy bajas en grasa con calorías adecuadas provenientes de carbohidratos y proteínas se sintetizan más ácidos de cadena media. Cuando la madre pierde peso el perfil de ácidos grasos de sus depósitos de grasa se refleja en su leche^{24, 25}. Por otro lado, la concentración del colesterol en la leche materna varía de 10 a 20 mg/mL y al parecer el consumo

temprano de este nutriente durante la lactancia podría relacionarse con cifras menores de este en etapas posteriores de la vida²⁶.

Orígenes del Desarrollo de la Salud y la Enfermedad

La hipótesis de los orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad (*DOHaD*, por sus siglas en inglés), antes conocida como “programación del desarrollo”, propone que la fisiología y metabolismo fetal y neonatal pueden ser alterados por cambios durante etapas tempranas del desarrollo, como la gestación y la lactancia.

Los principales agentes de la programación intrauterina o del desarrollo son los factores de crecimiento, nutrientes y hormonas. El suplemento nutricional y el crecimiento fetal están directamente ligados y son consecuencia de la salud y nutrición materna, así como del flujo sanguíneo uterino, incluyendo la función placentaria y el estado del sistema endócrino. La influencia nutricional durante el embarazo está considerada como causa dominante de la programación fetal²⁷⁻²⁹. El cerebro y el eje Hipotálamo Hipófisis Adrenal (HPA, por sus siglas en inglés *Hypothalamic Pituitary Adrenal*) son muy sensibles a la programación durante estas etapas.

Estas alteraciones generan una respuesta fisiológica permanente en el feto que se asocia con el desarrollo de enfermedades en el adulto²⁹⁻³¹. El feto metabólicamente programado presenta modificaciones permanentes en la estructura y fisiología de órganos, así como en la expresión de genes involucrados en su propio metabolismo³².

Actualmente se sabe gracias a los estudios con animales de experimentación y a la epidemiología clínica que el fenotipo de un individuo no está determinado exclusivamente por sus genes, existe además una fuerte influencia ambiental, teniendo mayor impacto en etapas tempranas del desarrollo. El ambiente subóptimo intrauterino y durante la lactancia modifica el crecimiento y predispone al individuo al desarrollo de enfermedades en la vida adulta³³⁻³⁷. Se han utilizado diferentes modelos para evaluar el efecto de la programación por una dieta materna alta en grasa y su efecto en el metabolismo de la progenie, mostrando que el cerebro y los órganos periféricos parecen ser afectados por una dieta hiperlipídica.

Estrés materno

La habilidad del organismo para adaptarse a su entorno es de vital importancia, la vida se mantiene gracias a un equilibrio dinámico y complejo conocido como homeostasis, proceso descrito por Claude Bernard y nombrada por Walter Cannon; cuando la homeostasis es alterada surgen respuestas adaptativas, estas respuestas se conocen con el nombre de estrés, el término fue introducido en 1936 por Hans Selye y se refiere a un mecanismo de defensa del organismo frente a una agresión; existe un nivel de actividad necesario para conservar la estabilidad en un ambiente de constantes cambios, a este fenómeno Sterling le dio el concepto de alostasis en 1988³⁸⁻⁴⁰.

La respuesta del cerebro ante situaciones de estrés es mediada por el sistema nervioso, neuroendocrino e inmune, los cuales tienen la función de recuperar nuevamente el estado de equilibrio del individuo, una de estas respuestas es el aumento de los niveles plasmáticos de los glucocorticoides. En los seres humanos, el principal glucocorticoide es el cortisol, mientras que en roedores es la corticosterona, ambos sintetizados a partir del colesterol en células de la corteza suprarrenal bajo el control de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), que junto

con las β -endorfinas, es liberada del lóbulo anterior de la hipófisis en respuesta a diferentes estresores, que a su vez es regulada por el factor liberador de la corticotropina (CRF), este péptido es liberado al sistema porta-hipofisiario, a través del cual es transportado hacia la hipófisis anterior, ahí estimula a los corticotropos para que sinteticen y secreten ACTH^{38, 40}.

Aun siendo muchas las personas que experimentan eventos estresantes no desarrollan patologías, el estrés crónico parece ser un factor que actúa solamente en aquellos individuos que son particularmente vulnerables. Esta vulnerabilidad puede a su vez depender del aumento permanente de la activación del eje HPA, asociado con factores epigenéticos. Investigaciones recientes se ha planteado la idea de que los mecanismos epigenéticos, pueden ejercer un control duradero sobre la expresión de genes sin alterar el código genético, además puede provocar cambios estables en la función cerebral. La vida perinatal es un periodo de mayor plasticidad por lo cual es especialmente sensible a factores de estrés^{41, 42}.

Por lo tanto, los acontecimientos adversos que ocurren en etapas tempranas del embarazo, modifica las concentraciones hormonales y/o la conducta materna que conlleva a una mala programación de la respuesta del eje HPA ante situaciones de estrés. Por ejemplo, se ha demostrado que el incremento en los niveles de glucocorticoides produce alteraciones estables en la metilación del ADN y la estructura de la cromatina, induciendo el aumento en la transcripción del gen del receptor de glucocorticoides, importante para el circuito de retroalimentación del eje HPA^{43, 44}.

El estrés cuando ocurre durante períodos críticos del desarrollo, como la vida neonatal y perinatal, puede afectar negativamente la conducta y la función

fisiológica como crecimiento, metabolismo, reproducción y respuesta inmune. Es posible especular que la plasticidad perinatal de los sistemas fisiológicos es un mecanismo importante para la adaptación del feto o del recién nacido a las condiciones ambientales después del nacimiento. Sin embargo, bajo condiciones extremas como el estrés, las crías mostraron anomalías fisiológicas y conductuales a corto y largo plazo^{45, 46}.

Estudios en roedores han demostrado que el estrés materno y la manipulación con glucocorticoides exógenos durante la gestación incrementa los niveles de corticosterona, hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y la hormona estimulante de corticotropina (CRH) tanto en la madre como en los fetos⁴⁷⁻⁴⁹. Los glucocorticoides son esenciales para el desarrollo normal del cerebro, pero la exposición excesiva puede tener efectos a largo plazo en la función neuroendocrina, cognitiva y emocional. La aparición de esos cambios dependerá del tiempo, la intensidad y la duración del estrés materno^{50-52, 42}.

El desarrollo del individuo depende de las condiciones nutritivas que haya tenido en la vida intrauterina y perinatal, ya que la dieta es elemental para la buena formación del sistema nervioso central⁵³. Actualmente se sabe que la mala nutrición durante etapas críticas del desarrollo puede tener efectos adversos sobre el desarrollo del cerebro⁵⁴, con mayor susceptibilidad en las neuronas del sistema límbico implicadas en las conductas afectivas y cognitivas. Por otra parte, se sabe que el sistema límbico juega un papel importante en la emoción, motivación y otras funciones del cerebro como memoria y aprendizaje; dentro de las estructuras relacionadas con estas actividades tenemos la corteza prefrontal, amígdala, tálamo, hipocampo, núcleo acumbens, hipotálamo, área tegumental ventral y núcleo raquídeo.

Al parecer la alimentación materna durante la gestación y la lactancia es uno de los factores determinantes en el desarrollo futuro de la progenie⁵⁵. Es importante recalcar que existen estudios de la restricción proteínica y obesidad materna con respecto a la conducta y aprendizaje de la progenie, sin embargo no de obesidad materna con intervención nutricional, motivo por el cual se realizara el presente trabajo.

Ansiedad relacionada con la conducta

La ansiedad además de ser una respuesta emocional al estrés, puede ser una reacción emocional de alerta ante una amenaza, se ha relacionado mediante diversos estudios a la amígdala con la ansiedad. El estado emocional de un animal se vuelve evaluable a través de una serie de tareas diferentes, podrían contribuir a aumentar la fiabilidad, rapidez y amplitud en las pruebas de comportamiento, se requieren varias pruebas para evaluar la conducta emocional de los roedores. Existen dos pruebas que junto con la determinación de corticosterona en suero son indicativas de estrés y ansiedad en roedores de laboratorio, que son la prueba del *Laberinto Elevado en Cruz (LEC)* y la *Prueba de Campo Abierto (CA)*⁵⁶⁻⁵⁹.

En LEC, el laberinto se encuentra elevado desde el suelo y consta de dos brazos abiertos y dos cerrados frente a frente interconectados por una plataforma central; las entradas en brazos abiertos se utilizan como índices experimentales de ansiedad, la reducción en los manejos exploratorios de los brazos abiertos del laberinto sirven como medida evaluatoria del incremento en los niveles de ansiedad. La prueba de Campo Abierto fue concebida en 1934 por Calvin Hall para proporcionar mediciones objetivas de la emocionalidad en ratas, es un recinto amplio que por lo general se encuentra muy iluminado, los roedores tienden a evitar el área no protegida central y concentrar su caminar cerca de las paredes,

algunos autores han relacionado la ansiedad con el número de defecaciones e inversamente con la actividad exploratoria desplegada dentro del contexto experimental. Desde el campo de la psicología experimental, el interés de estas pruebas se extendió rápidamente entre los neurocientíficos, farmacólogos y más recientemente en genética molecular, ya que evalúan la influencia de diversos factores en las conductas emocionales⁵⁶⁻⁶⁰.

Efectos del aprendizaje y la motivación

El aprendizaje es el proceso por el cual adquirimos el conocimiento, un hábito afectivo o una habilidad intelectual o motora, mientras que la memoria es la facultad por la que el conocimiento es codificado, almacenado, consolidado, y posteriormente recuperado. La memoria puede ser dividida en declarativa y no declarativa, la primera constituye el pensamiento consciente y su acción principal se localiza en el hipocampo localizado dentro de los lóbulos temporales este tipo de memoria es importante para el aprendizaje de información nueva; mientras que la segunda es el pensamiento inconsciente y su función se encuentra localizada en el cuerpo estriado, amígdala y núcleo de accumbens⁶¹⁻⁶⁵.

A finales del siglo XIX Iván Pavlov “descubrió” el condicionamiento clásico, posteriormente el condicionamiento instrumental fue acuñado por E. Thorndike que es una prueba conductual en la cual los organismos aprenden a emitir respuestas para obtener o evitar consecuencias importantes, que se rige por la ley efecto en donde la probabilidad de una respuesta conductual particular aumenta o disminuye dependiendo de las consecuencias que la siguen. Posteriormente B. F. Skinner desarrolló un aparato de aprendizaje automatizado que fue adoptado de manera general por otros investigadores que lo llamaron “*caja de Skinner*” en la que una rata presiona una palanca y a cambio recibe una recompensa, a esto se le nombra Condicionamiento Operante, y el hecho de que cada respuesta tenga

una consecuencia que incrementa la probabilidad de que se repita se le llama Reforzamiento. En el condicionamiento clásico, los animales reciben una consecuencia, hayan aprendido la respuesta condicionada o no, por el contrario, en el condicionamiento instrumental la consecuencia sólo ocurre si el animal da una respuesta^{65, 66}.

Uno de los programas de reforzamiento se llama reforzamiento continuo, lo que significa que cada respuesta siempre va seguida de la consecuencia, dentro del reforzamiento continuo se encuentra el programa de Razón Fija, en donde debe emitirse un número invariable de respuestas antes de dar el reforzamiento, es decir, se entrega el reforzamiento después de un número constante de respuestas, con ambas pruebas se determina el aprendizaje en los roedores. Los efectos de la motivación en el aprendizaje se evalúan con el programa de Razón Progresiva, en el cual la rata necesita cada vez mayor número de respuestas que aumentan progresivamente para recibir el reforzamiento⁶⁰.

Condicionamiento instrumental en el cerebro

El estímulo activa la corteza sensorial (por ejemplo, la visión de un palanca activa la corteza visual); la información viaja de aquí al sistema motor, incluyendo los ganglios basales y la corteza motora; las salidas pueden producir una respuesta conductual, como presionar la palanca. Si la respuesta es reforzada por una consecuencia, como el alimento, comerlo activa el sistema del gusto, incluyendo los núcleos gustativos del tallo cerebral. Las salidas del sistema gustativo, aunadas al hambre (señaladas por el hipotálamo), activan un “sistema de reforzamiento” hipotético. Las salidas del sistema de reforzamiento viajan al sistema motor, donde fortalecen las asociaciones activas de la corteza visual (y

otras áreas de la corteza sensorial). Lo que hace más probable que la próxima vez que encuentre el estímulo se produzca la misma respuesta⁶⁰.

Planteamiento del problema

La obesidad y el sobrepeso en la última década han alcanzado cifras alarmantes que incluyen a mujeres en edad reproductiva. Se ha observado un aumento en la obesidad en México que incluye a mujeres en edad reproductiva, de tal forma que en mujeres de 20 a 49 años de edad, la prevalencia de la suma de sobrepeso y obesidad aumentó de 34.5% en 1988 a 61% en 1999 y a 69.3% en 2006¹⁶. Tras la concepción, estas mujeres convertidas en madres obesas se caracterizan por tener comprometida la salud propia y la del producto. Es sabido que el fenotipo de un individuo no sólo está determinado por el genotipo sino también por el ambiente en el que se desarrolla, de tal forma que las alteraciones nutricionales durante periodos críticos del desarrollo como gestación y lactancia pueden modificar su fisiología y metabolismo permanentemente. Aunque el abordaje epidemiológico de este fenómeno ha resultado bastante informativo, es necesario su estudio de manera experimental. En modelos con animales se ha demostrado que las crías descendientes de madres con obesidad experimental muestran predisposición a enfermedades metabólicas en la edad adulta; sin embargo a la fecha existe información escasa acerca del efecto de la obesidad materna sobre alteraciones en la conducta afectiva y aprendizaje de la progenie.

Por lo que en el presente proyecto se propone a fin de determinar los efectos de la obesidad materna en la descendencia y tratar de explorar más a fondo las alteraciones en periodos críticos del desarrollo. Con los resultados obtenidos se podrá tratar de explicar el origen de las alteraciones cognitivos y afectivos en la descendencia y sobre todo probar experimentalmente alternativas que reviertan los efectos adversos de la obesidad materna, sentando las bases para su posible aplicación en humanos.

Hipótesis

La alimentación alta en grasa en las madres producirá que se presente un fenotipo típico de la obesidad, con base en la teoría de la programación del desarrollo que plantea el impacto nutricional materno sobre la progenie, las posibles alteraciones conductuales y sobre el aprendizaje que puedan existir en las crías causadas por una dieta alta en grasas podrán prevenirse al menos parcialmente después de la intervención nutricional previa a la gestación de la rata o al inicio de ésta.

Objetivos

General

- Provocar experimentalmente el fenotipo de la obesidad en ratas madres mediante una alimentación alta en grasas, evaluar los efectos de la intervención nutricional materna previo y durante la gestación sobre la conducta y aprendizaje en la progenie.

Particulares

- Determinar los efectos de una dieta alta en grasas en ratas madres con respecto a la ganancia de peso corporal.
- Medir las concentraciones de corticosterona sérica en las madres de los diferentes grupos experimentales.
- Saber si existe relación de la obesidad materna con una ganancia de peso corporal mayor en las crías de estas ratas y si la intervención nutricional previa a la gestación y a su inicio previene esta predisposición a adquirir el fenotipo de obesidad.
- Determinar las concentraciones de corticosterona sérica en las crías de ratas de los diferentes grupos experimentales.
- Evaluar la conducta y ansiedad en las crías de ratas de los diferentes grupos experimentales.
- Evaluar el aprendizaje y la motivación de las crías.

Diseño experimental

Se emplearon ratas Albinas especie *Rattus norvegicus* de la cepa Wistar (obtenidas de Charles River Laboratories, Inc.), provenientes de la colonia mantenida en el departamento de Investigación Experimental y Bioterio (DIEB) del Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ). Cabe señalar que todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética e Investigación en Animales (CINVA) del mismo instituto. El alimento y el agua se encontraron disponibles *ad libitum* durante todo el estudio. Los machos empleados para aparear a las hembras se alimentaron con dieta control y durante todo el estudio todas las ratas permanecieron en el área concedida dentro de las instalaciones del bioterio del DIEB, donde se mantuvieron en ambientes de humedad relativa y temperatura controladas 75% y $22\pm 2^{\circ}$ C, respectivamente con ciclos de luz/obscuridad de 12 horas (luz: 07:00-19:00 horas). Los animales fueron alojados en cajas estándar de acrílico (adecuadas para ratas, conocidas comúnmente como de tamaño jumbo) con una cama de aserrín de madera virgen (Aspen Chip Laboratory Bedding de Northeastern Products Corp.) cambiada periódicamente. Se colocaron de 3 a 4 animales por cada caja hasta antes del apareamiento, periodo a partir del cual sólo se colocó a una hembra por caja hasta el final del estudio.

Criterios

Criterios de inclusión

Se incluyeron en el estudio aquellas ratas que quedaron preñadas.

Se ajustaron las camadas a 10 crías cada una y se incluyeron en el estudio.

La presente tesis sólo reporta los resultados de crías machos.

Criterios de exclusión.

Se descartaron a las ratas que no quedaron preñadas.

Fueron excluidas las ratas madres que se hayan comido a sus crías.

Se excluyeron las camadas con menos de 10 crías o más de 14 cada una.

Variables

Dependientes

Dieta control y alta en grasas.

Intervención nutricional previa a la gestación y durante la gestación.

Independientes

Peso corporal de las ratas madres.

Peso corporal al nacimiento de las crías.

Peso corporal de las crías.

Concentraciones de corticosterona sérica en las ratas madres y crías.

Ansiedad, aprendizaje y conducta motivacional de las crías determinadas a través del Laberinto Elevado en Cruz LEC, prueba de Campo Abierto CA junto con las concentraciones de corticosterona.

Material y métodos

Animales Experimentales

Madres

Las ratas se dividieron en cuatro grupos experimentales de acuerdo al tipo de dieta que recibieron desde el destete.

Grupo Control (C): Recibieron dieta Control desde el destete hasta el final de la lactancia de las crías (De los 21d hasta los 165d, llevándose a cabo el apareamiento a los 120d en todos los grupos experimentales)

Grupo de Obesidad Materna (OM): Fueron alimentadas con dieta alta en Grasa de manteca desde el destete hasta el final de la lactancia de las crías (De los 21d hasta los 165d)

Grupo de Intervención Previa a la Gestación (IPG): Se le dio dieta alta en Grasa de manteca desde el destete hasta un mes previo a la gestación (De los 21d hasta los 90d), y se cambió la dieta a Control a partir de los 90d de edad hasta el final de la lactancia de las crías (165d de edad).

Grupo de Intervención en la Gestación (IG): Fueron alimentadas con dieta alta en Grasa de manteca desde el destete hasta una vez iniciada la gestación (De los 21d hasta los 120d) y se cambió dieta a Control al inicio de la gestación y la lactancia de las crías (hasta los 165d de edad)

Grupos	Dieta Materna			
	21-90 d	90-120 d	Gestación	Lactancia
Control (C)	Control	Control	Control	Control
Obesidad Materna (OM)	Grasa	Grasa	Grasa	Grasa
Intervención Previa a la Gestación (IPG)	Grasa	Control	Control	Control
Intervención en la Gestación (IG)	Grasa	Grasa	Control	Control

Dietas

La dieta Control consistió en: alimento comercial para roedor Rodent RQ 22-5 de Zeigler®, formulada para mantenimiento, crecimiento, reproducción y lactancia de ratas y ratones convencionales conteniendo 5% (p/p) de grasa y un contenido energético de 4 Kcal/g. Mientas que la dieta Alta en Grasa fue elaborada en la planta piloto del Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (DCyTA) del INNSZ, cuyo contenido de grasa fue del 25%(p/p), y el energético de 5 Kcal/g, con una formulación diseñada con base a la recomendación AIN-93 del American Institute of Nutrition⁵² así como modificaciones hechas a esta, por la Dra. Elena Zambrano y colaboradores¹⁰. Para su elaboración se utilizó una mezcladora de paletas Hobart modelo A-200 de 20 L de capacidad, potencia de 1/3 HP y 1425 rpm.

	(% (p/p))	
Nutriente	Dieta control	Dieta Alta en Grasa
Proteína	22.0	23.4
Grasa	5.0	25.0
Polisacáridos	31.0	21.05
Azúcares simples	31.0	21.05
Fibra dietética	4.0	5.0
Minerales	6.0	3.5
Vitaminas	1.0	1.0
Contenido Energético	4 Kcal/g	5 Kcal/g

Composición Nutricional de las Dietas.

Componente	Concentración (g/100g de Dieta)
Caseína	11.6
Caseinato de Calcio	11.6
L-Cistina, Diclorhidrato	0.3
Mezcla de Minerales AIN-76	5.0
Mezcla de Vitaminas AIN-93 VX	1.0
Colina, Clorhidrato	0.17
A-Celulosa	5.0
Almidón de Maíz	20.59
Glucosa Anhidra	20.59
Aceite de Soya	5.0
Manteca de Cerdo	20.0

Formulación de la Dieta Alta en Grasa.

Los reactivos que se utilizaron para la elaboración de las dietas se enlistan a continuación:

Caseína libre de vitaminas, de HarlanTeklad

L-Cistina Diclorhidrato, de Sigma Aldrich

Mezcla de Minerales AIN-76, de Harlan México S.A. de C.V.

Mezcla de Vitaminas AIN-93 VX, de Harlan México S.A. de C.V.
Colina, Clorhidrato de Sigma Aldrich
 α -Celulosa de Sigma Aldrich
Almidón de maíz de Droguería Cosmopolita S.A. de C.V.
Glucosa Anhidra de Droguería Cosmopolita S.A. de C.V.
Aceite Comestible Puro de Soya Nutrioli® de Ragasa Industrias S.A. de C.V.
Manteca de Cerdo de JC Fortes®

La dieta se elaboró de la siguiente manera.

Se pesó según la formulación mencionada arriba en el texto la cantidad correspondiente de cada componente por separado usando la balanza analítica Sartorius® ED623SCW así como la báscula EURA® 2000/100 (cap. máx.=100 Kg y d=50g), según la sensibilidad requerida en cada caso.

Se adicionó primero la cantidad requerida de manteca de cerdo en la mezcladora de paletas y se accionó en velocidad intermedia durante 5 minutos o bien hasta que la manteca se distribuyó uniformemente en el fondo.

Se mezclaron todos los componentes sólidos durante 5 minutos en velocidad baja en la mezcladora (siendo las mezclas: de vitaminas AIN-76 y de minerales AIN-93VX las últimas en incorporarse).

Después, sin detener el mezclado se agregó la cantidad correspondiente del aceite de soya.

A velocidad intermedia se mezcló por 5 minutos más o hasta haber obtenido una masa homogénea de consistencia adecuada para ser roída por los animales y a la vez ser moldeada con las manos.

La dieta se almacenó en bolsas de polietileno opacas, por lapsos no mayores a un mes en un cuarto frío de 4°C.

Medición de peso corporal e ingesta

A partir de los 21 días de edad de las madres, se midió y registró el peso corporal de cada una semanalmente; del día 90 al 105 se midió su ingesta y de manera diaria durante la gestación y la lactancia, dicha determinación se realizó, colocando 3 o 4 animales del mismo grupo en una misma caja y pesando la cantidad de alimento presente en el comedero cada día a las 10:00 horas, reponiéndolo de tal manera que la cantidad de este no sea inferior a 50 g. Los cálculos se realizaron de acuerdo a la Ec. 2, las pesadas se realizaron en una balanza analítica ADAM® modelo PGW 1502e, (capacidad=1500g, d=0.01g), usándola en la función de pesaje de animales para el caso del peso corporal.

$$Ingesta\ Individual = \frac{A_i - A_f}{n}$$

Ec. 2. Donde:

A_i= alimento inicial (g de alimento en el comedero el día anterior a la determinación)

A_f= alimento final (g de alimento en el comedero el día de la determinación)

n= animales en la caja durante la determinación

Apareamiento y determinación de la preñez

Una vez que las hembras alcanzaron la edad de 120 d, se ubicaron en cajas separadas de manera individual, en la misma caja se colocó un macho de edad adulta de fertilidad probada a fin de que se efectuara el apareamiento.

Para comprobar que se realizó el apareamiento posterior a la colocación del macho, se llevó a cabo un frotis vaginal cada 24 horas (a las 08:00 hrs). La observación de espermatozoides se consideró como resultado positivo para el

apareamiento (tomando el día del hallazgo como el día cero de gestación), momento en el cual el macho fue retirado de la caja de la hembra. Los frotis se teñirán con solución de Lugol (obtenida de la Farmacia del Área de Hospitalización del INNSZ) y observados a 100x con un microscopio fotónico (Axiostar Plus de Carl Zeiss®). Al mismo tiempo las madres fueron pesadas diariamente, y un aumento de peso al transcurrir los días se considero como positivo de gestación.

Crías. Medidas al nacimiento

Al nacer las crías fueron pesadas y se determinó la talla de las crías de los diferentes grupos experimentales por medio de un calibrador con vernier (de Scala®, d=0.1mm) para esto la medición se realizó desde la punta de la nariz hasta la base de la cola. Cabe aclarar que las crías se les asignó el mismo grupo experimental al que pertenecieron las madres, desde el nacimiento hasta los 21 d fueron alimentadas por sus madres (lactancia) y al fin de este periodo hasta el fin del proyecto se le dio dieta Control a todas ellas.

Pruebas conductuales

Dos semanas antes iniciar todas las pruebas de conducta el ciclo de luz se invirtió (luces apagadas de 7 a.m. a 7 p.m.) efectuando las pruebas durante la fase oscura. Las pruebas se realizaron los 7 días a la semana durante la fase del ciclo oscuro entre las 8 a.m. y 2 p.m. La prueba de Laberinto Elevado en Cruz LEC se inició a los 75 días de edad de las crías machos, al término de esta prueba se continuó con la prueba de Campo Abierto CA. Posteriormente a los 80 días de edad de las crías machos se empezó la prueba de Condicionamiento Operante, una vez terminada estas pruebas se prosiguió con la Prueba de Razón Progresiva.

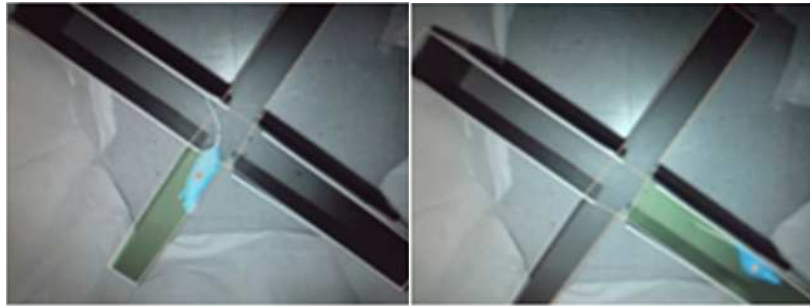
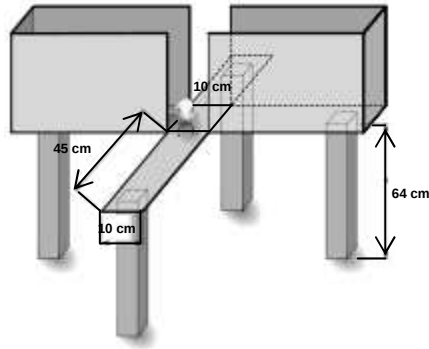
Laberinto Elevado en Cruz (LEC)

El LEC fue montado en plástico de color gris oscuro situado a 64 cm por encima del suelo. Se compone de dos brazos con protección (brazos abiertos) uno frente al otro, y dos brazos protegidos por altas paredes grises (brazos cerrados). Los cuatro brazos (45 cm x 10 cm cada uno) se extiende desde una plataforma central común (10 cm x 10 cm).

El nivel de luz fue de 30 lux en los brazos abiertos y 6 lux en los brazos cerrados. La posición de la rata en el laberinto se monitoreó con ayuda de una cámara de video, la cual fue colocada en el techo centrada al laberinto y se conectó al sistema de video de seguimiento de análisis de movimiento, que se ejecuta en una computadora personal.

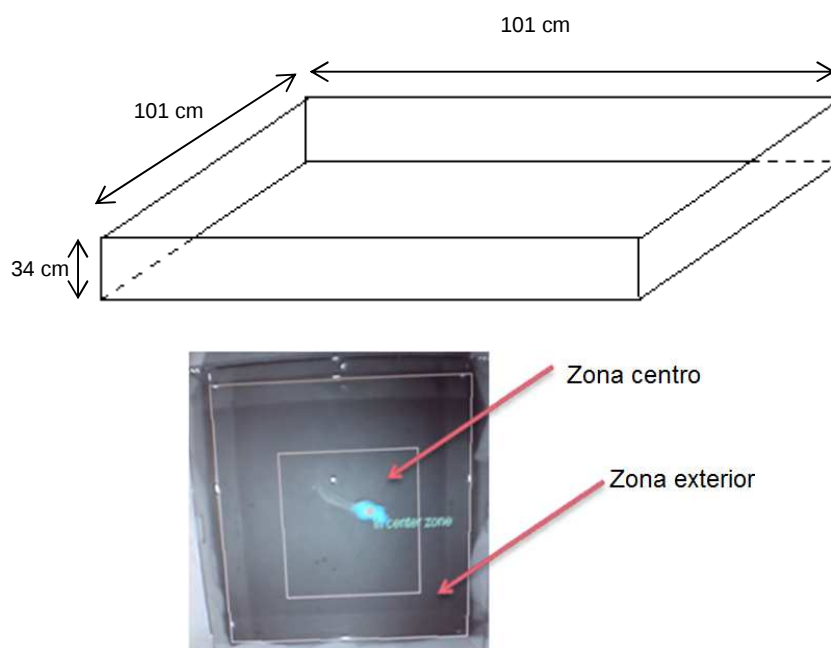
Para iniciar la sesión, cada rata se colocó individualmente en el centro del laberinto frente a un brazo abierto. Después de 10 min de exploración en el Laberinto Elevado en Cruz, la rata se devolvió a su jaula hogar y se limpió el Laberinto con etanol al 70%. De forma manual se anotaron el número de entradas falsas en las que sólo se asomaba la rata, estas se descartaban al momento de realizar el conteo final.

En la prueba de LEC se consideraron cuatro parámetros de valoración que son: A. el Número de Entradas a los brazos abiertos, B. el Tiempo en segundos que las ratas crías permanecían en los brazos abiertos, C. la Distancia expresada en metros que las crías recorrían cada vez que ingresaban a los brazos abiertos y D. la Distancia Total expresada en metros que recorrieron las crías en los brazos abiertos y cerrados. Se contó con una n=6 de cada grupo experimental.



Campo Abierto

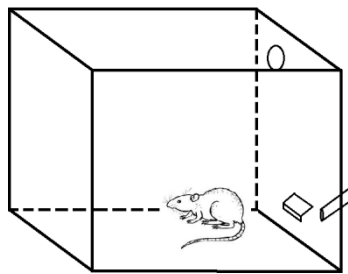
Los mismos animales estudiados para Laberinto Elevado en Cruz se evaluaron al día siguiente en una prueba de Campo Abierto durante 10 min. El campo abierto esta hecho de plexiglás grises oscuros, consiste en un campo cuadrado (101 cm x 101 cm y 34 cm de alto) el cual se colocó en un cuarto de experimentación iluminado por una luz baja (12 lux). Una cámara de video fue colocada en el techo centrada al campo conectado a un monitor y un sistema de video de análisis de movimiento para registrar la actividad locomotora. En el campo abierto hay un cuadrado virtual que dentro de esta zona se midió la actividad locomotora de las ratas. Cada rata fue colocada individualmente en el centro del campo abierto, donde se evaluaron. Después de cada periodo de sesiones la zona se limpió con etanol al 70%.



Condicionamiento Operante y Prueba de Razón Progresiva

Dos semanas antes del inicio del entrenamiento operante los animales fueron colocados en privación de agua durante 23 horas al día con una hora de acceso libre; esto se realizó durante los días que duraron las pruebas y con 1 hora de acceso libre inmediatamente después de las sesiones de conducta. A los 80 días después del día de nacimiento seis crías machos de diferentes camadas por grupo (mismas ratas ocupadas para las pruebas conductuales anteriores) fueron probadas en cámaras operantes (E10-10TC, Coulbourn-Instruments, PA, EE.UU.) cuentan con ventilación, paredes de atenuación del sonido (E10-20, Coulbourn-Instruments, PA, EE.UU.) y equipado con una palanca extraíble de respuesta y un recipiente para contener líquido (E14-05, Coulbourn-Instruments, PA, EE.UU.) Estas cajas tienen dos paredes laterales de aluminio y una pared posterior y frontal de plexiglás claro. Cada una de las cajas contiene un suelo de rejilla y durante las sesiones de pruebas se iluminaron con luz difusa. La palanca de respuesta y el compartimento de la recompensa se encuentran en la pared lateral derecha.

Para cada ensayo la palanca se extendió para ser presionada, después se le permitió al animal acercarse al compartimento donde recibió la recompensa al presionar la palanca cada 120 s. Donde se registró gracias a los receptores de foto células, se encendió una luz y el animal obtuvo su recompensa, una gota de solución de sacarosa (0,01mL, 7%) desde un depósito de recompensa hasta un recipiente donde cayó la gota.



Procedimiento de las pruebas conductuales

Reforzamiento libre.- Antes del entrenamiento los animales se colocaron por primera vez en la cámara, por 10 minutos, en donde automáticamente el equipo dio acceso libre a la solución de sacarosa al 7%. Esta prueba permitió que el animal reconociera y se adaptara al área.

Adquisición del aprendizaje.- Subsecuentemente al primer día del entrenamiento, se les enseñó a los animales a asociar la presión de la palanca (estímulo condicionado) con la obtención de la recompensa FR-1 Reforzamiento de Razón Fija 1 (*Fixed Ratio 1*), en esta prueba los animales presionaban la palanca una vez para recibir la recompensa. El registro del aprovechamiento por los fotoreceptores se inició una vez que el animal consumiera su recompensa. El entrenamiento FR-1 fue finalizado cuando el animal hizo más de 20 respuestas durante la sesión de 15

min. Esta prueba fue de utilidad para determinar el tiempo que tardó el animal en adquirir el aprendizaje.

Reforzamiento y almacenamiento.- Después de haber completado la prueba del FR-1, los animales fueron introducidos a la prueba de FR-5 Reforzamiento de Razón Fija 5, con los criterios de funcionamiento idéntico al FR-1, sólo que esta vez el animal tuvo que presionar 5 veces la palanca para obtener la recompensa.

Evento Progresivo.- Después de las sesiones de entrenamiento los animales fueron colocados en la Prueba Progresiva (PR) por diez días. En la prueba de PR, la respuesta incrementa al doble cada 8 reforzamientos y por ello el número de presiones sucesivas de la palanca para obtener la recompensa fue de la siguiente manera $PR + 1 = 1, 2, \dots, 8$; $PR + 2 = 10, 12, \dots, 24$; $PR + 4 = 28, 32, \dots, 56$; $PR + 8 = 64, 72, \dots, 120$; $PR + 16 = 136, 152, \dots$ etc. Cada sesión de PR duró 30 minutos, esta prueba permitió evaluar la motivación del animal.

Consumo libre de sacarosa

Un día después de la última sesión prueba de Razón Progresiva, se les dio a los animales acceso directo a la solución de sacarosa en una botella (0,01 mL, 7%) durante 30 minutos. Para esta evaluación se colocaron los animales en cajas individuales tamaño jumbo y la cantidad de consumo de sacarosa se calculó mediante la sustracción del peso de la botella después del periodo de consumo del peso inicial. Este procedimiento se realizó en tres días consecutivos con el fin de evaluar la conducta apetitiva y consumatoria.

Mediciones de corticosterona

Se determinó la concentración de corticosterona por Radio-Inmuno Ensayo (RIA por sus siglas en inglés), la cual resulta una técnica altamente sensible y específica. En dicha técnica, una concentración establecida de antígeno marcado (radiactivamente) mezclada con una concentración desconocida de antígeno considerado como el analito (de la muestra) es incubada con una dilución constante de antisuero de tal forma que la concentración de sitios de unión al antígeno en los anticuerpos es limitada, (por ejemplo, cuando sólo el 50% del antígeno puede ser unido al anticuerpo). De tal forma que en este sistema habrá una competencia entre los antígenos marcados y no marcados (provenientes de la muestra), por el número limitado y constante de los sitios de unión disponibles en el antisuero. Así, la cantidad de antígeno marcado unido al anticuerpo disminuirá a medida que la concentración de antígeno no marcado aumente. Esto puede ser medido después de separar el complejo antígeno-anticuerpo formado del antígeno marcado libre (por inmunoprecipitación por ejemplo), midiendo la radiactividad ya sea de una u otra fracción o bien de ambas, pudiéndose establecer una curva patrón con una serie de estándares que incrementen su concentración de antígeno no marcado y a partir de ésta curva, la cantidad desconocida de antígeno en la muestras puede ser calculada (Lehninger et al., 2008).

A los 19 días de gestación de las madres de los diferentes grupos experimentales y crías de 110 días después del nacimiento se realizó eutanasia por decapitación obteniendo muestras de sangre del cuello de las ratas para determinar las concentraciones de corticosterona sérica. Las muestras de sangre se centrifugaron a 4° C por 15 minutos a 3500 rpm para remover las células sanguíneas y almacenar el suero a -20° C hasta su análisis. Las concentraciones de corticosterona en suero se determinaron por radioinmunoanálisis usando un estuche comercial para ratas, DPC Coat-a-count (TKRC1) de Diagnostic Products (Los Ángeles, CA, EE.UU).

Previamente al día del sacrificio se retiró el alimento por 4 horas a las ratas dejándoles sólo acceso al agua *ad libitum*. Se realizaron extracciones sanguíneas a las madres de la cuenca ocular por rasgadura leve de la glándula lagrimal (para evitar al máximo la hemólisis de la muestra y traumatismo en el animal), para ello los animales fueron anestesiadas colocándolas dentro de una cámara de vidrio conteniendo un paño empapado con éter etílico (Analyzed ACS Reagent de J.T. Baker®), una vez anestesiado el animal, por medio de un tubo capilar para microhematocrito heparinizado, se realizó la extracción de aproximadamente 750 μ L de sangre.

En las crías y madres después del destete se recolectó la sangre obtenida de la región cervical, al momento de realizar la eutanasia por decapitación rápida, con una guillotina para roedor (Thomas Scientific), al final de la lactancia en las madres ~163 días, así como de las crías seleccionadas a los 110 días.

Las muestras sanguíneas fueron recolectadas en tubos de polipropileno para microcentrífuga de 1.5 mL, se dejó formar el coágulo, Posteriormente se centrifugaron las muestras en una microcentrífuga 5415C Eppendorf® a 10000 rpm (8154 $\times$ g) durante 10 minutos, y después se separó el suero el cual se congeló inmediatamente a -20°C, hasta su procesamiento.

Análisis estadístico

Todos los animales se seleccionaron al azar para formar las muestras consideradas para diversas mediciones que se realizaron en este estudio, los datos se expresaron como la media aritmética $\pm$ el error estándar (EE). La *n* además del número de animales experimentales de la muestra en cuestión, también puede referirse al número de cajas empleadas para las determinaciones de la ingesta alimentaria, (alojando de 3 a 4 animales como máximo para evitar

competencia por la comida), asimismo también puede referirse al número de camadas, en cada caso se realizara la indicación pertinente.

El efecto del patrón de alimentación materno entre los grupos experimentales tanto en crías como en las mismas madres fue analizado en los diversos parámetros considerados en este estudio por medio del análisis de varianza de una vía (ANOVA por sus siglas en inglés) y las diferencias entre medias se determinaron con la prueba de Tukey *post hoc*. Un valor de $P < 0.05$ se consideró como significativo.

Los criterios de valoración de la conducta y los niveles de corticosterona fueron analizados por ANOVA de una vía con los análisis *post hoc* utilizando Tukey (SigmaStat 3,5).

Resultados

Madres Experimentales

Parámetros Obtenidos Antes de la Gestación

Peso Corporal

Los valores promedios muestran que la ganancia de peso corporal de las hembras alimentadas con dieta alta en grasas (Obesidad Materna) OM fue mayor y muestran diferencias significativas con respecto a las alimentadas con dieta Control C a partir del día 50 hasta los 119d; el grupo intervenido (Intervención Previa a la Gestación) IPG muestra dichas diferencias con respecto al grupo C a partir de los 70d hasta los 106d, disminuyendo posteriormente la ganancia de peso, mostrándose el efecto de la intervención nutricional llevada a cabo a partir del 90d de este grupo, por lo que a partir de los 106d hasta los 119d muestra diferencias significativas con respecto al grupo OM. Figura 1.

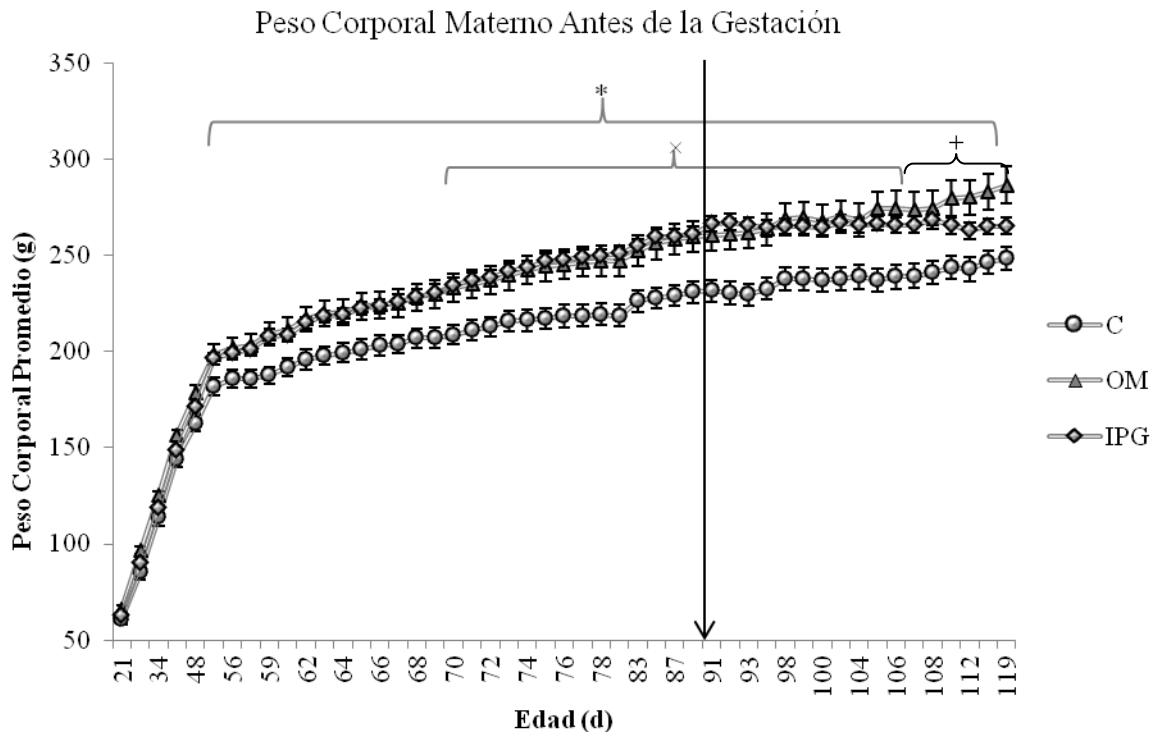


Figura 1. Peso Corporal Materno antes de la Gestación. Los datos se expresan como la Media $\pm$ EE, los símbolos denotan diferencias significativas ($P < 0.05$), "*" para OM vs C, "x" para IPG vs C y "+" para OM vs IPG. Donde Control $n=13$ (C), Obesidad Materna $n=22$ (OM), Intervención Previa a la Gestación $n=9$ (IPG). La flecha indica el día de la intervención nutricional en la IPG a las 90 d.

Ingesta de alimento

La ingesta promedio de alimento de las hembras de los 90-104 d (después de la intervención en el grupo de Intervención Previa a la Gestación IPG) evidencia que el grupo de Obesidad Materna OM consumió una menor cantidad de alimento de manera individual ($10.3 \pm 0.1 \text{ g rata}^{-1} \text{ d}^{-1}$) que los grupos que consumían dieta Control C en ese periodo: IPG ($12.5 \pm 0.3 \text{ g rata}^{-1} \text{ d}^{-1}$) y C ($13.7 \pm 0.2 \text{ g rata}^{-1} \text{ d}^{-1}$), de tal forma que los valores entre cada uno de los grupos fueron estadísticamente diferentes. Figura 2.

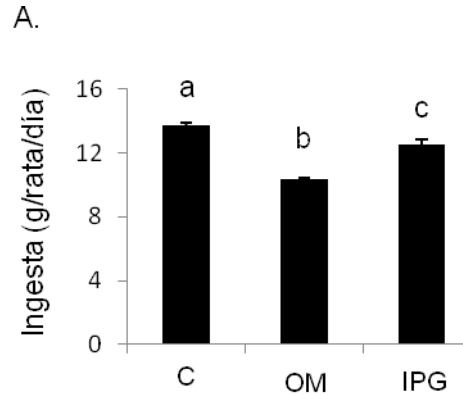


Figura 2. Ingesta diaria de las hembras antes de la gestación (promedio 90d-104d). Ingesta de la cantidad de alimento. Donde Control $n=13$ (C), Obesidad Materna $n=22$ (OM), Intervención Previa a la Gestación $n=9$ (IPG). Los datos están expresados como la Media $\pm$ EE, grupos que no comparten la misma letra son estadísticamente diferentes ($p<0.05$).

Parámetros Maternos Durante la Gestación y Lactancia

Ingesta de Alimento

La cantidad promedio ingerida de alimento por rata a lo largo de la gestación y la lactancia en general es menor en el grupo Obesidad Materna OM respecto a los demás grupos estudiados, en particular del grupo Control C aunque sólo hay diferencias significativas en algunos días; asimismo la ingesta del grupo OM fue significativamente diferente del grupo de Intervención Previa a la Gestación IPG principalmente al final de la gestación y a lo largo de la lactancia. Figura 3.

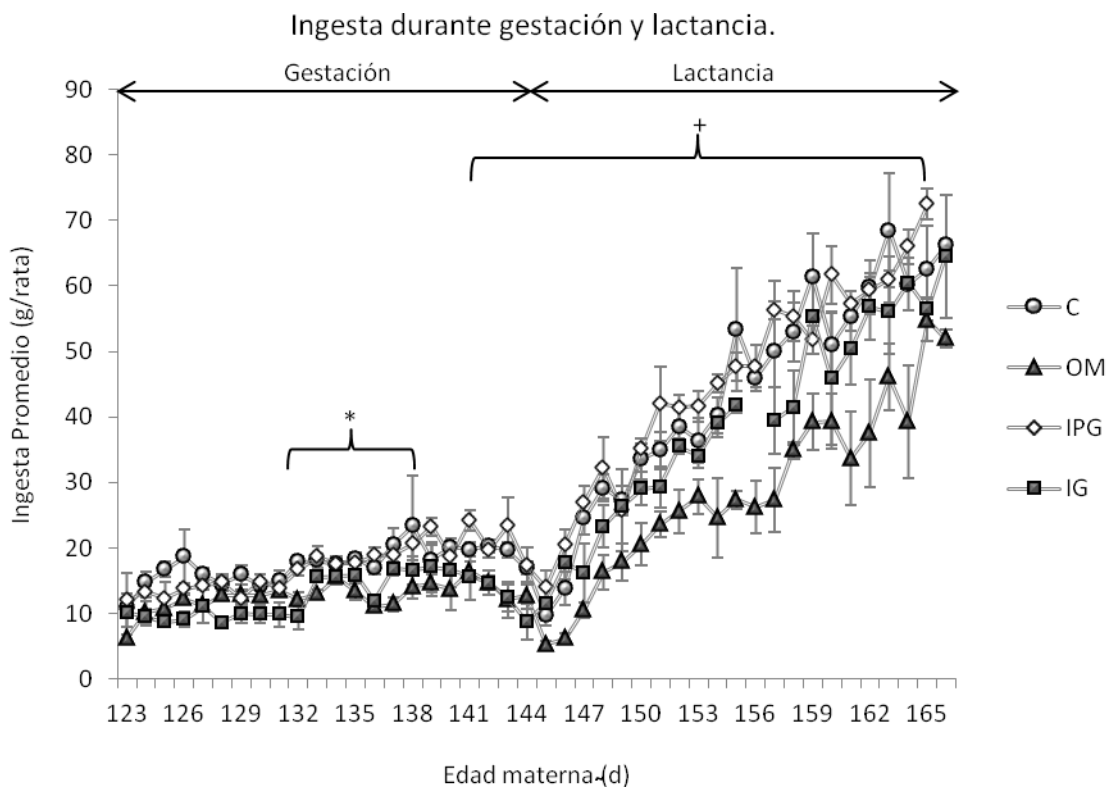


Figura 3. Ingesta de alimento de las madres durante la gestación y lactancia. Los datos se muestran como la Media $\pm$ EE. Donde Control n= 8 (C), Obesidad Materna n= 5 (OM), Intervención Previa a la Gestación n= 8 (IPG), Intervención en la Gestación n= 4 (IG). Los símbolos denotan diferencias significativas ($p < 0.05$) en el día indicado: * (OM vs C) + (OM vs IPG).

Peso Corporal

El inicio de la gestación determinado por frotis vaginal ocurrió en un rango de 120 $\pm$ 2 d de edad de las ratas experimentales de todos los grupos. El registro diario del peso corporal durante la gestación y la lactancia mostró que el promedio más alto obtenido durante estos periodos correspondió al grupo de Obesidad Materna OM, para el cual se observaron diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo Control C desde el primer día de gestación hasta el final de la lactancia; asimismo, se observaron diferencias respecto al grupo de Intervención Previa a la Gestación IPG, principalmente en la gestación y respecto al grupo Intervención en la Gestación IG durante la gestación y la lactancia. Sin embargo, los grupos IPG e IG no mostraron diferencias significativas entre ellos ni respecto

al C, aunque llama la atención que el peso corporal materno en IG durante la lactancia es menor que el control. Figura 4.

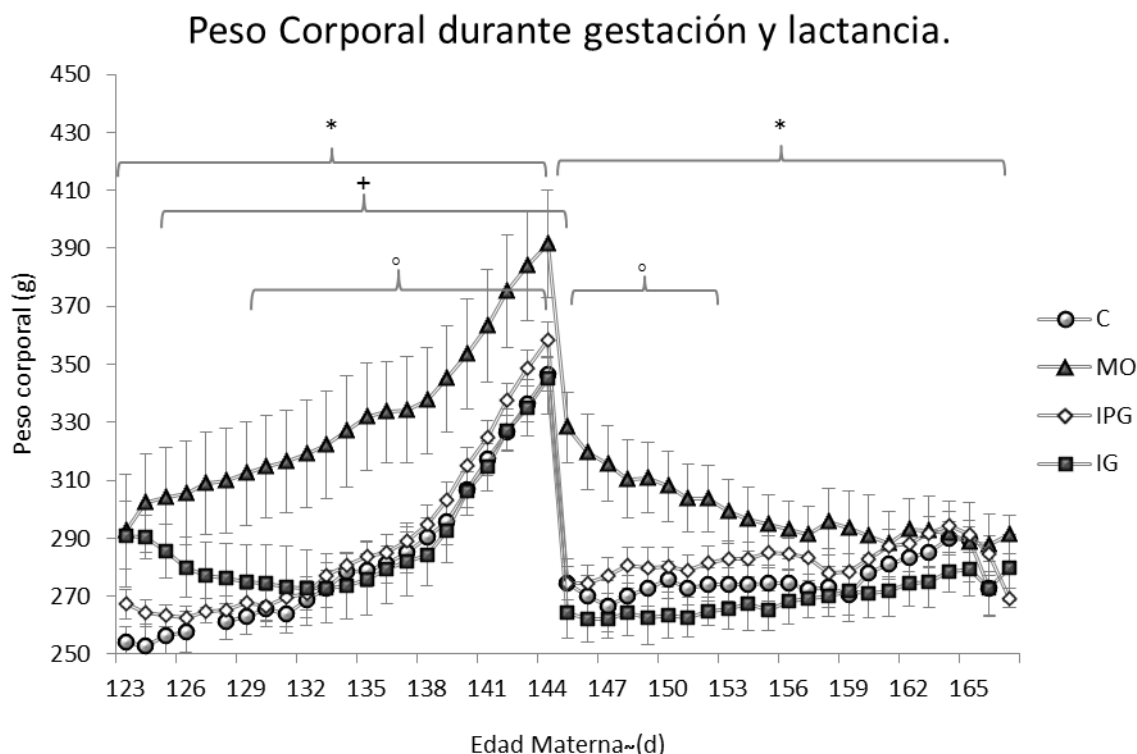


Figura 4. Peso Corporal de las Madres Durante la Gestación y Lactancia Los datos se muestran como la Media $\pm$ EE. Los símbolos denotan diferencias significativas en el día indicado: * (OM vs C), + (OM vs IPG) y ° (OM vs IG). Donde n= 10 Control C, n= 5 Obesidad Materna OM, n= 8 Intervención Previa a la Gestación IPG y n= 4 Intervención en la Gestación IG.

Corticosterona Materna

Con respecto a las concentraciones de corticosterona en suero al día 19 de gestación, se observó un incremento en el grupo de Obesidad Materna OM contra el grupo control C mostrando diferencias estadísticamente significativas, y los grupos con intervención nutricional IPG e IG mostraron concentraciones intermedias en comparación con C y OM. Figura 5.

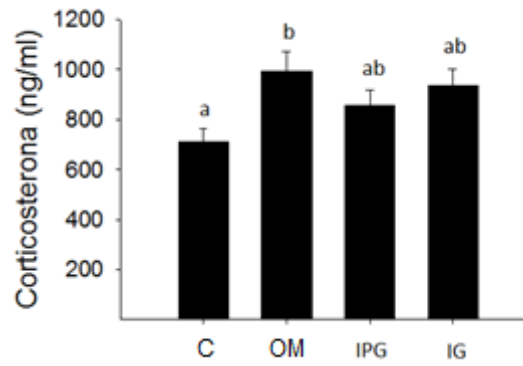


Figura 5. Concentraciones de corticosterona materna en suero a los 19 días de Gestación. Donde $n= 6$ Control C, $n= 6$ Obesidad Materna OM, $n= 6$ Intervención Previa a la Gestación IPG y $n= 6$ Intervención en la Gestación IG. Los datos se expresan como la Media $\pm$ EE. Los datos que no comparten al menos una letra son estadísticamente diferentes ($p<0.05$).

Crías Experimentales

Parámetros Obtenidos en las crías al destete (21 días de Lactancia)

Peso Corporal y Talla al Nacimiento

Los datos registrados, muestran que no existen diferencias significativas entre grupos en cuanto al peso y talla corporal. Tabla 1.

Grupo	C	OM	IPG	IG
	Machos al nacimiento			
n(♂/camada)	4 ± 0.6	5 ± 0.8	3 ± 0.5	5 ± 1.5
Peso (g)	6.7 ± 0.19	6.4 ± 0.18	6.7 ± 0.23	6.5 ± 0.39
Talla(cm)	5.2 ± 0.06	5.3 ± 0.06	5.2 ± 0.06	5.1 ± 0.11

Tabla 1. Peso y Talla al nacimiento de las crías machos. Camadas n= 13 Control C, n= 7 Obesidad Materna OM, n= 10 Intervención Previa a la Gestación IPG, n= 4 Intervención en la Gestación IG. Los datos se expresan como Media ± EE.

Peso Corporal Durante la Lactancia

De acuerdo a los registros obtenidos del peso corporal de las crías durante el periodo de lactancia, el grupo de Obesidad Materna OM presenta los valores más bajos durante los primeros 5 días respecto a los demás grupos control C, Intervención Previa a la Gestación IPG y el de Intervención en la Gestación IG, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas respecto a ellos. Alrededor del día 11 se observa un incremento en el peso corporal de las crías del grupo OM comparado con los grupos restantes, detectando diferencias significativas en este grupo respecto a IPG y al IG respecto al C. El grupo IG, fue inferior respecto al C presentando diferencias significativas a partir del día 11 hasta al 13 de lactancia Figura 6.

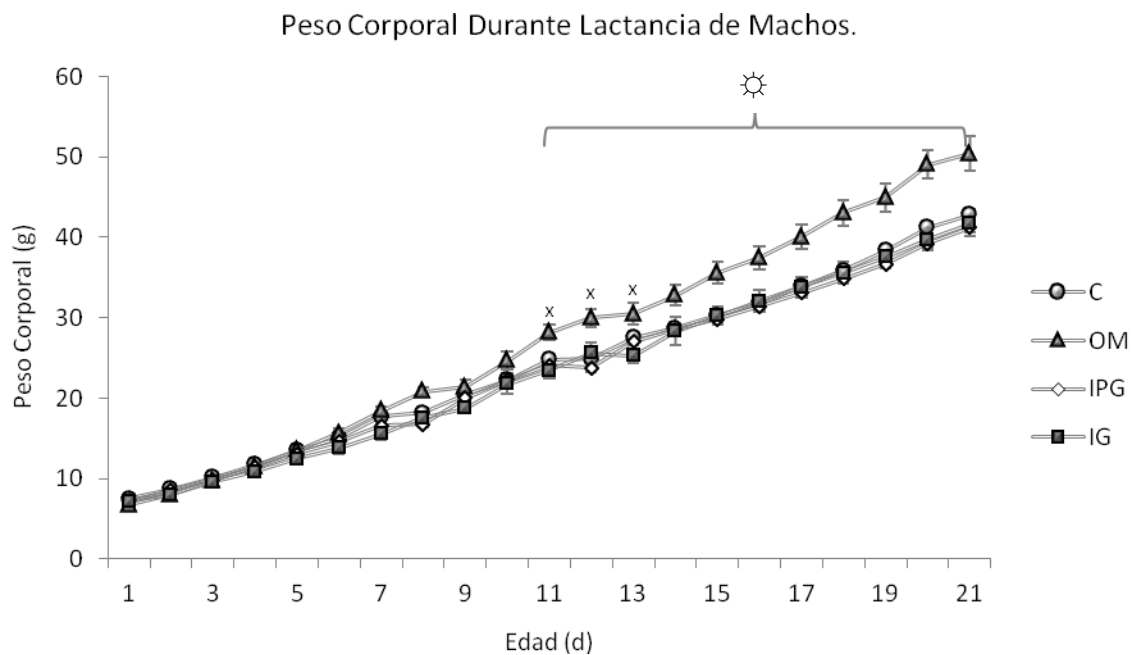


Figura 6. Peso Corporal de las Crías Durante Lactancia de las crías Machos. Los datos se muestran como la Media $\pm$ EE. . Donde n=49 Control C, n= 26 Obesidad Materna OM, n= 35 Intervención Previa a la Gestación IPG y n= 10 Intervención en la Gestación IG. Los símbolos denotan diferencias estadísticamente significativas: x (IG vs C) ☼ (OM vs C, IPG e IG), $p < 0.05$.

Parámetros Obtenidos Después del Destete (21 Días de Edad)

Peso Corporal de los 21 a 72 días de edad

El peso corporal promedio después del destete de las crías indica que en los machos a lo largo de su crecimiento no se presentan diferencias significativas entre grupos experimentales. Figura 7.

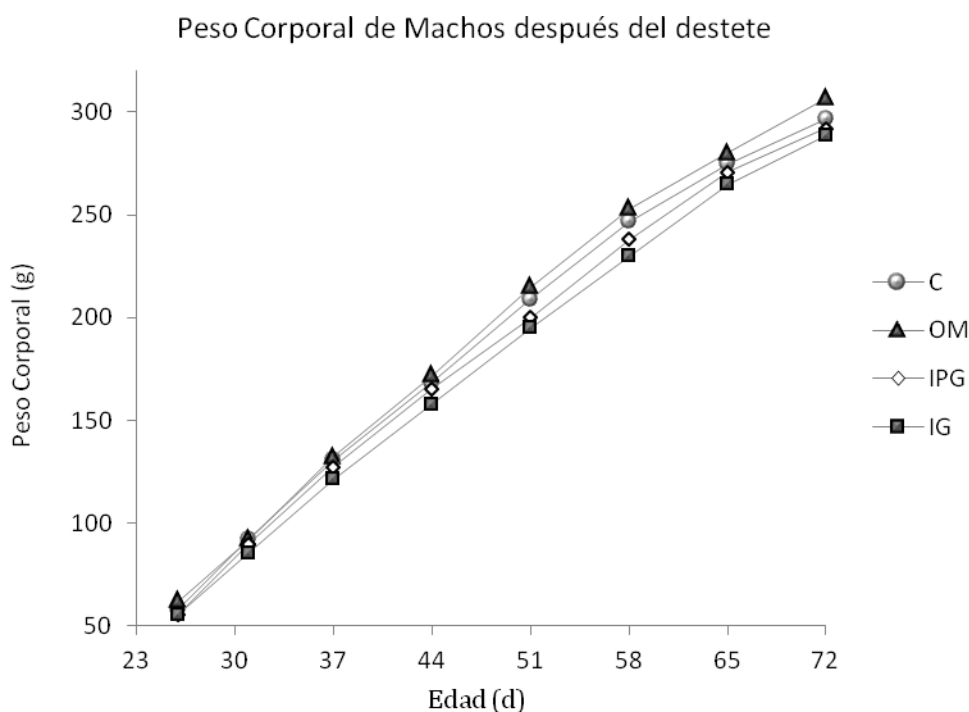


Figura 7. Peso Corporal de las crías Machos después del destete (21-72 d). . Donde n= 30 Control C, n= 21 Obesidad Materna OM, n= 33 Intervención Previa a la Gestación IPG y n= 14 Intervención en la Gestación IG. Los datos se muestran como la Media $\pm$ EE. $p < 0.05$.

Parámetros a los 70 días de Edad

Ingesta y Peso Corporal

Los registros del peso corporal e ingesta de las crías fueron tomados a partir de los 70 d durante 4 días consecutivos, se puede observar que el promedio de consumo diario de alimento en los machos no es estadísticamente diferente entre grupos: C (n=8 cajas), OM (n=6 cajas) IPG (n=6 cajas) e IG (n=4 cajas). Ni en el peso corporal promedio a estos, durante este periodo, aunque es posible observar que el menor peso en las mediciones corresponde al C (n=22) respecto a los grupos OM (n=22), IPG (n=25) e IG (n=14). Figura 9.

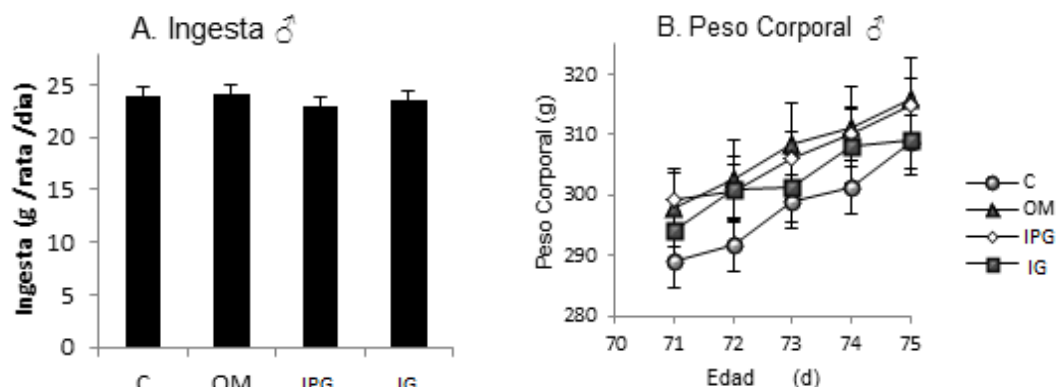


Figura 8. Ingesta y Peso Corporal de las Crías de los 71 a los 75 d. A. Ingesta, donde C (n=8 cajas), OM (n=6 cajas) IPG (n=6 cajas) e IG (n=4 cajas). B. Peso Corporal, donde C (n=22) respecto a los grupos OM (n=22), IPG (n=25) e IG (n=14). Los datos se muestran como Media $\pm$ EE.

Parámetros a partir de los 75 días de Edad. Pruebas Conductuales

Laberinto Elevado en Cruz (LEC)

En ninguno de los cuatro parámetros de evaluación (número de entradas, tiempo promedio, distancia promedio recorrida en los brazos abiertos y distancia total recorrida) se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales Control C, Obesidad Materna OM, Intervención Previa a la gestación IPG e Intervención en la Gestación IG; aunque el número de entradas a los brazos abiertos fue mayor en las crías de los grupos experimentales OM, IPG e IG de con respecto al grupo control C, siendo más visibles en los grupos OM e IG. Figura 9.

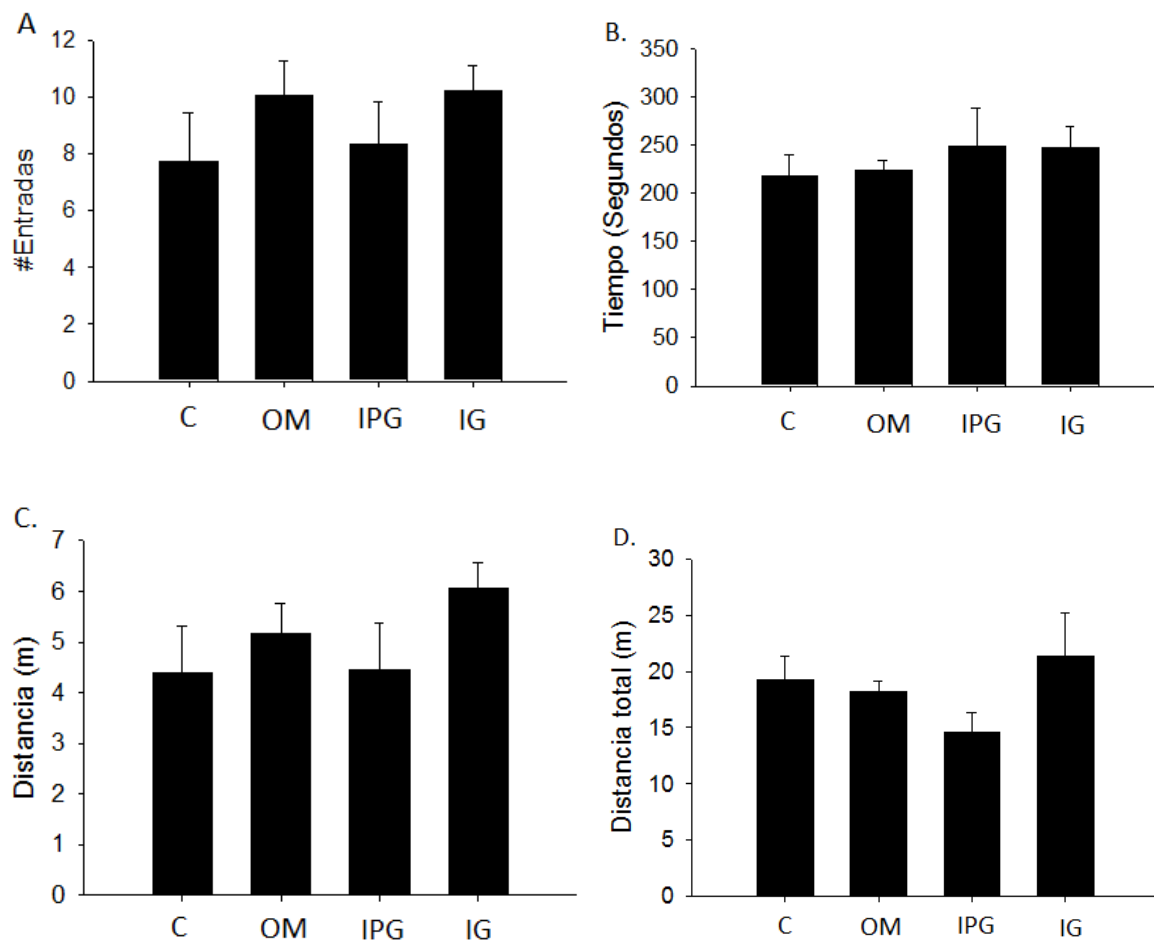


Figura 9. Criterio de valoración de la prueba del Laberinto Elevado en Cruz (LEC) en las Crías Machos. A. Número de entradas en los brazos abiertos. B. Tiempo (segundos) de permanencia en los brazos abiertos. C. Distancia (m) recorrida en los brazos abiertos. D. Distancia (m) total recorrida en los brazos abiertos. Donde n=6 en los grupos experimentales Control C, Obesidad Materna OM, Intervención Previa a la Gestación IPG e Intervención en la Gestación. Los datos se muestran como Media $\pm$ EE.

Prueba de Campo Abierto

Los criterios de valoración de la conducta en la prueba de Campo Abierto revelaron diferencias en las crías experimentales. El grupo de Obesidad Materna OM e Intervención en la Gestación IG ha aumentado las entradas en la zona fronteriza en comparación con las crías Control C. La descendencia IG ha incrementado las entradas de la zona centro frente a C y el aumento de la distancia recorrida en la zona fronteriza, la distancia en la zona fronteriza y el tiempo en la zona centro. Tabla 2. y Figura 10.

Grupo	Distancia Total (cm)	# Entradas en la Zona Fronteriza	Tiempo en la Zona Fronteriza (segundos)	Distancia en la Zona Fronteriza (cm)
C	44.3±4.8	12.3±1.7a	569.1±9.7 ^a	39.1±4.2
OM	56.6±10.8	22.3±2.9b	539±6.0a	48.7±10.2
IPG	50.5 ± 5.0	16.3±2.4ab	547±9.3ab	43.8±4.1
IG	48.5 ± 4.5	25±6.2b	461±17.4b	36.5±3.2

Tabla 2. Criterios de valoración para la prueba de Campo Abierto. Donde n=8 en los grupos experimentales Control C, Obesidad Materna OM, Intervención Previa a la Gestación IPG e Intervención en la Gestación. Los datos se muestran como Media ± EE. Los datos que no comparten letra son estadísticamente diferentes p<0.05.

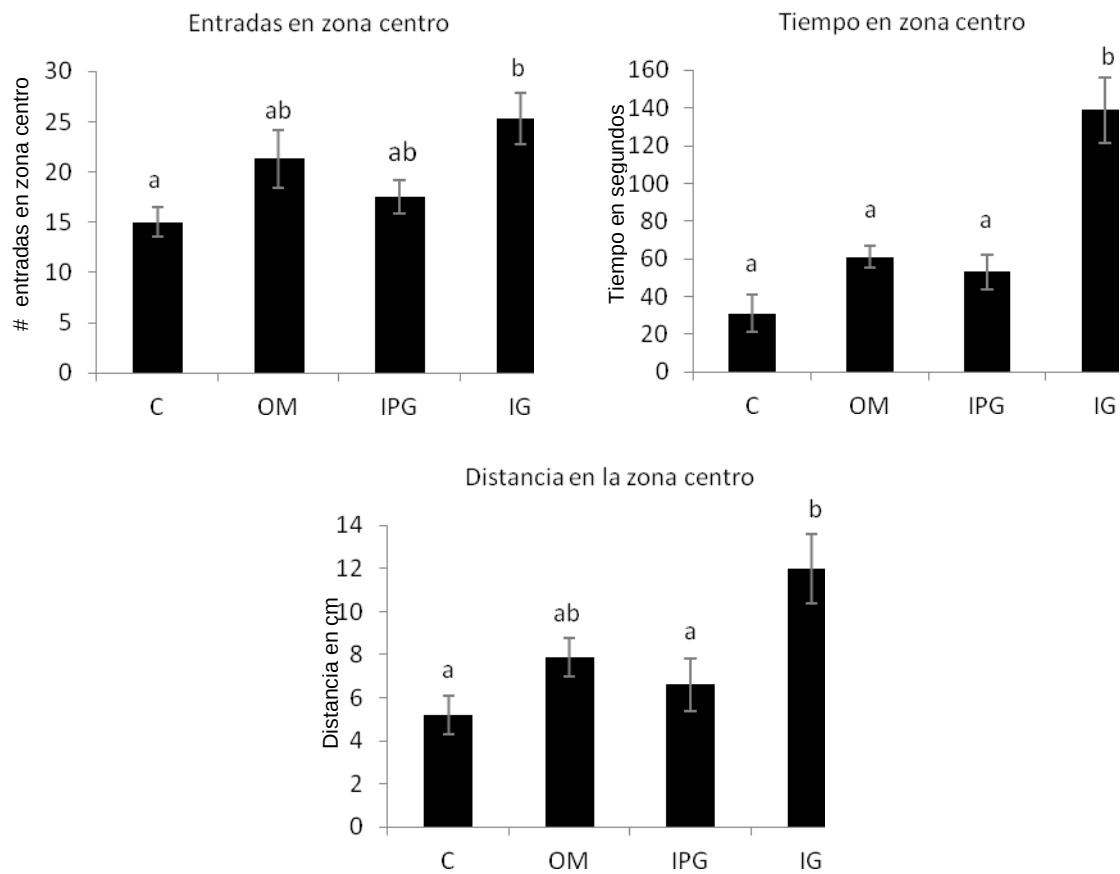


Figura 10. Criterios de valoración para la prueba de Campo Abierto. Donde n=8 en los grupos experimentales Control C, Obesidad Materna OM, Intervención Previa a la Gestación IPG e Intervención en la Gestación. Los datos se muestran como Media $\pm$ EE. Los datos que no comparten letra son estadísticamente diferentes $p < 0.05$.

Condicionamiento Operante y prueba de Razón Progresiva

La exposición inicial a la cámara operante revela diferencias en el número de sesiones requeridas para aprender a relacionar la presión de la palanca con la obtención de una recompensa por primera vez, donde los grupos de Obesidad Materna OM, Intervención Previa a la Gestación IPG e Intervención en la Gestación IG requieren más sesiones para responder en comparación al grupo Control C, sin embargo, el grupo IG mostró necesitar un menor número de sesiones respecto a los grupos OM e IPG, pero mayores que el grupo C. Para la prueba de Razón Fija FR-1 las diferencias entre grupos fueron determinadas por el número de sesiones requeridas para que las crías alcanzaran los criterios establecidos para esta prueba, de presionar la palanca una vez para recibir una recompensa, donde se da la adquisición del aprendizaje, los grupos OM, IPG e IG necesitaron más números de sesiones para lograr alcanzar el desempeño adecuado, las crías del grupo OM fue el que necesitó más número de sesiones, los grupos IPG e IG muestran valores menores que el grupo OM pero mayores al grupo C. En el programa de Razón Fija 5 FR-5, donde se da el reforzamiento y almacenamiento del aprendizaje, muestra a las crías OM, IPG e IG que necesita más número de sesiones en comparación con las crías del grupo C para alcanzar los criterios establecidos de la prueba, de presionar la palanca 5 veces para recibir una recompensa. En las pruebas de Razón Progresiva se evalúan los efectos de la motivación, los resultados muestran mayor respuesta en la descendencia OM, obteniendo un mayor número de recompensas en comparación con los grupos C, IPG e IG. Figura 11.

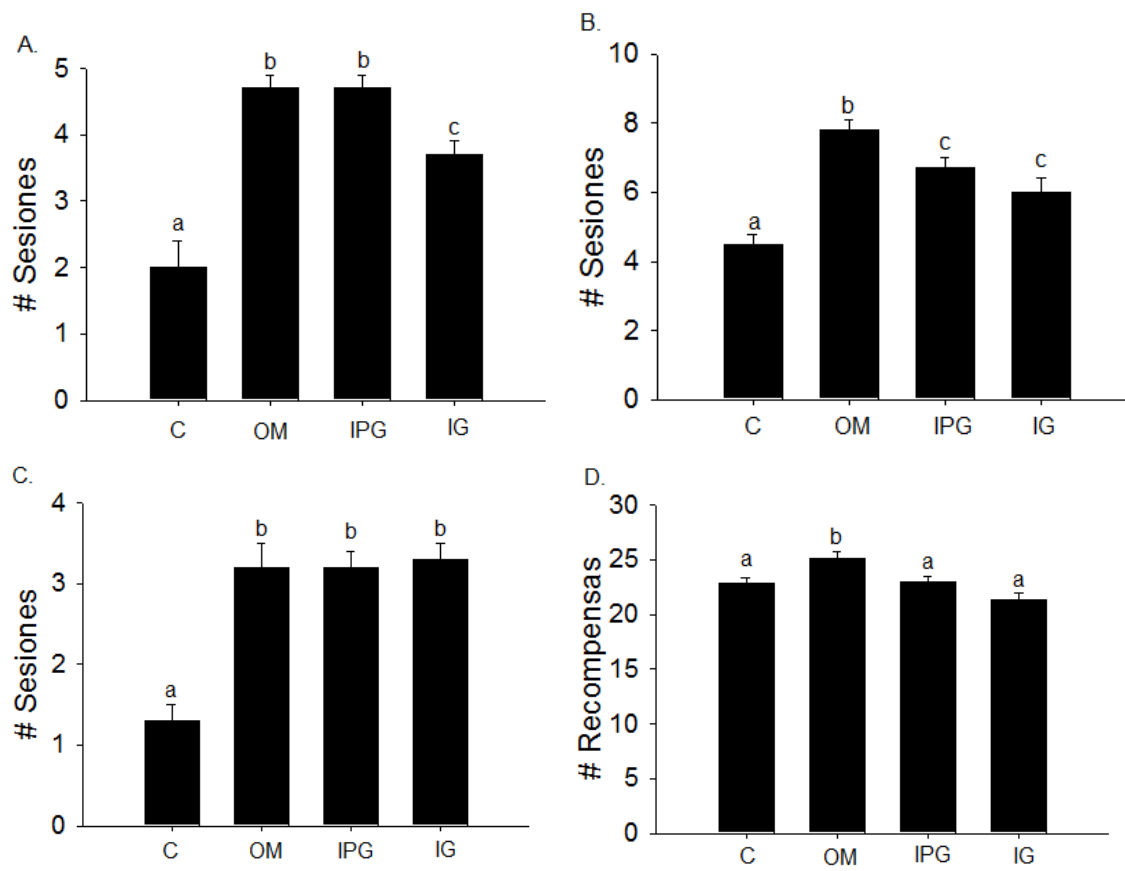


Figura 11. Condicionamiento Operante y Prueba de Razón Progresiva. A. Número de sesiones que requieren las crías para el reforzamiento libre donde presionan por primera vez la palanca para obtener una recompensa. B. FR-1. C. FR-5. D. Número de recompensas recibidas durante las sesiones de razón progresiva. Donde $n=6$ en los grupos experimentales Control C, Obesidad Materna OM, Intervención Previa a la Gestación IPG e Intervención en la Gestación. Los datos se muestran como Media $\pm$ EE. Los datos que no comparten letra son estadísticamente diferentes $p<0.05$.

Consumo Libre de Sacarosa

Posterior a las pruebas conductuales se les dio libre acceso a las crías de solución Sacarosa al 7%, no mostrando diferencias estadísticamente significativas entre grupos. Tabla 3.

	C	OM	IPG	IG
Machos (ml)	18.4 ± 0.3	17.3 ± 0.3	18.5 ± 0.3	18.0 ± 0.3

Tabla 3. Consumo promedio de sacarosa al 7% de Machos durante tres sesiones de 30 minutos. Donde n=6 en los grupos experimentales Control C, Obesidad Materna OM, Intervención Previa a la Gestación IPG e Intervención en la Gestación. Los datos se muestran como Media ± EE. $p < 0.05$.

Mediciones de Corticosterona

Los niveles de corticosterona sérica se midieron en las crías a los 110d. mostró que el grupo OM tiene valores promedios menores en comparación con la descendencia IPG y el IG, pero no contra las crías del grupo C que muestra valores intermedios. Figura 12.

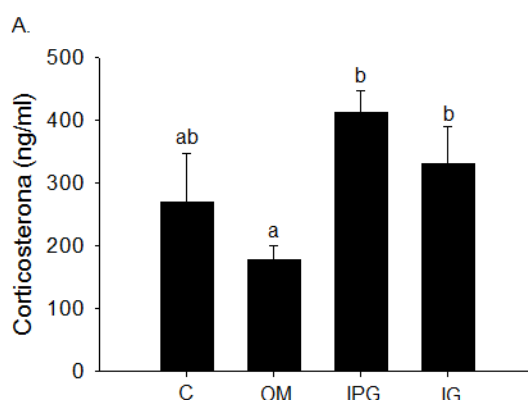


Figura 12. Concentración sérica de corticosterona en crías machos. Donde n=6 en los grupos experimentales Control C, Obesidad Materna OM, Intervención Previa a la Gestación IPG e Intervención en la Gestación. Los datos se muestran como Media ± EE. Los datos que no comparten letra son estadísticamente diferentes $p < 0.05$.

Discusión

La obesidad es el resultado del desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético, por lo que alimentos ricos en energía provocarán un fenotipo de obesidad; de esta forma la dieta alta en grasa administrada *ad libitum* provocó que las madres experimentales del grupo de obesidad materna OM ganaran mayor peso, en comparación con el grupo Control C. La intervención nutricional previa a la gestación IPG y durante la gestación IG redujo significativamente el peso corporal materno, esto indica que un cambio en los hábitos alimenticios reduciendo la cantidad de grasa ingerida previene el sobrepeso durante etapas críticas como lo son gestación y lactancia.

La obesidad experimental inducida por dieta, usualmente es asociada con la sobrealimentación. Sin embargo, se observó que en las ratas madres alimentadas con dieta alta en grasa OM su consumo de alimento fue menor en comparación con las ratas del grupo control C y del grupo con intervención, antes y durante gestación (IPG e IG), así como en lactancia. La dieta alta en grasa contiene como única fuente de azúcares simples la glucosa, es sabido que la rata tiene una preferencia innata por el sabor dulce⁶⁸ y puede asociar el sabor con los efectos metabólicos y gastrointestinales de la comida, es decir, que el fenómeno observado se le puede atribuir a la falta de predilección ya que este tipo de dieta contiene menor cantidad de azúcares. Sin embargo, la prueba de consumo libre de sacarosa, nos indicó que no tienen una predilección real por el carbohidrato, por lo que podemos decir que la rata consume el alimento que necesita y la ganancia de peso no es por la cantidad de alimento ingerido sino por el tipo de dieta que se consume.

Al nacimiento, las crías de los diferentes grupos experimentales no mostraron diferencias en el peso corporal ni en talla. Sin embargo, a partir de los 11 días de edad y hasta el fin de la lactancia las crías de madres obesas OM mostraron mayor ganancia de peso. Es posible que este efecto se deba a que la leche de las madres obesas presenta un contenido de lípidos mayor y menor cantidad de agua⁶⁹. Asimismo, se ha reportado en ratones que la exposición a una dieta alta en grasa desde edades tempranas (de 3 a 4 semanas) incrementa la atracción por dietas densamente calóricas en la edad adulta implicando la modificación de algunos mecanismos neurológicos centrales⁷⁰.

Los efectos observados después del destete en el peso corporal no se pueden considerar como consecuencias directas de la lactancia y el contenido lipídico de la leche materna, sino que más bien son atribuibles a la programación del desarrollo. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales, tanto la ingesta como el peso corporal por lo que podemos decir que la obesidad no depende solo de la alimentación de la madre durante etapas críticas como son gestación y lactancia si no también del tipo de dieta que se ingiere, cabe recordar que después del destete todas las crías de los diferentes grupos fueron alimentadas con dieta control.

Las concentraciones de corticosterona son aceptadas como parámetros de estrés, en el caso de las madres las ratas del grupo de obesidad materna OM muestra los valores promedios mayores y los grupos de intervención nutricional previo IPG y durante la gestación IG valores intermedios, lo que indica que la intervención reduce el estrés producido por el consumo de dieta alta en grasa sin llegar a la recuperación.

En el caso de las crías, las provenientes de madres obesas muestran valores menores de corticosterona en comparación con el grupo control. Estudios experimentales indican que la exposición a glucocorticoides durante la vida fetal reduce en el hipotálamo la expresión del receptor de glucocorticoides, que a su vez regulan por inhibición la actividad del eje hipotálamo – hipófisis - adrenal (HPA). El estrés se define como una respuesta de una señal de alarma, es un mecanismo de defensa, pero si el estímulo perdura el organismo entra en una etapa de resistencia, es necesario un nivel adecuado de la hormona corticosterona para producir dicha respuesta, en las crías de madres alimentadas con una dieta alta en grasa los valores son inferiores al control, que bien podría traducirse en una inadecuada respuesta de la hormona,^{9, 38, 39}.

Es sabido que para evaluar la ansiedad de un animal se requieren de varias pruebas conductuales, como lo son Laberinto Elevado en Cruz LEC y la prueba de Campo Abierto CA, cuya finalidad de cada una de estas pruebas es determinar los niveles de ansiedad mediante la reducción en los manejos exploratorios de los brazos abiertos del LEC y las áreas centrales de CA. En el presente estudio se realizó la prueba del Laberinto Elevado en Cruz sin encontrarse diferencias significativas, sin embargo, la prueba de Campo Abierto nos indica que no hay cambios en la ansiedad en las crías de ratas con Obesidad Materna OM y en el caso del grupo de Intervención en la Gestación IG se muestra más exploratorio.

Mediante la “caja de Skinner” se realizaron las pruebas de aprendizaje, mediante el Condicionamiento Operante donde la rata recibe una recompensa como respuesta a una acción en particular, primero se le dio acceso libre para que el animal relacione la palanca con la recompensa observándose que las crías de madres OM e IPG necesitan mayor número de sesiones para que esto ocurra, de igual manera, donde el programa FR-1 y FR-5 requieren una o cinco veces respectivamente que se presione la palanca las crías OM y con intervención

necesitan un mayor número de sesiones, por lo que la obesidad materna trae consigo problemas sobre el aprendizaje de las crías, en algunos casos los grupos intervenidos muestran reducción en el número de sesiones que requieren para alcanzar los criterios establecidos para la prueba correspondiente en comparación con el grupo de obesidad materna, sin embargo, no es suficiente para poder decir que la intervención nutricional previene los efectos sobre los problemas de aprendizaje.

Estudios previos reportan que el factor neurotrófico derivado del cerebro del hipocampo disminuye junto con la neurogénesis del hipocampo con deterioro en el aprendizaje espacial en crías de ratones expuestos a una dieta alta en grasas durante gestación y lactancia^{71, 72}. Hay abundantes pruebas de que las altas concentraciones de glucocorticoides en el útero perjudican el desarrollo del cerebro y el comportamiento posterior en humanos y modelos animales^{73, 74}, que podrían explicar los déficits cognitivos demostrados en este estudio.

Las crías machos no se ven afectadas motivacionalmente, la descendencia OM es mayor en comparación con los demás grupos experimentales ya que el número de recompensas recibidas no es alterado por la intervención dietética aunque si por la dieta alta en grasas

Se ha señalado que las crías de madres alimentadas con una dieta alta en grasas durante la gestación y la lactancia desarrollan hiperfagia y una preferencia por los alimentos grasos, azucarados y salados, en el presente estudio las crías machos no muestran efecto alguno sobre el consumo de sacarosa, por lo que no puede atribuírsele a una preferencia de la solución sobre las pruebas de aprendizaje y la motivación.

Conclusiones

La dieta alta en grasa produce que las ratas madres aumenten de peso y adquieran algunos de los fenotipos de la obesidad, elevándose las concentraciones de corticosterona lo que podría afectar el aprendizaje de las crías machos, sin embargo, la intervención materna antes y durante la gestación es capaz prevenir el aumento acelerado de peso corporal, lo que indica que un cambio en la alimentación en estas etapas críticas es benéfica, también previene al menos parcialmente los problemas de aprendizaje y motivación en las crías disminuyendo estos efectos desfavorables de la obesidad materna. El presente estudio muestra la importancia de optimizar la dieta materna para evitar las complicaciones que conlleva una dieta alta en grasas.

Bibliografía

1. Gutiérrez JP, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernández S, Franco A, Cuevas-Nasu L, Romero-Martínez M, Hernández-Ávila M. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública
2. OMS. 2011. Obesity and overweight [Online]. WHO. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
3. González-Barranco, J. (ed.) 2004. Obesidad, México: Mc Graw Hill.
4. Coppack, S. W. 2005. Adipose tissue changes in obesity. Biochem Soc Trans, 33, 1049-52.
5. Braguinsky, J. Síndrome Metabólico ¿Enfermedad metabólica? Una mirada abierta desde la clínica. Ed. Médica. A. W. W. E. Buenos Aires. 2006.
6. Mayer, J. & Thomas, D. W. 1967. Regulation of food intake and obesity. Science, 156, 328-37.
7. Ganong, W. F. (ed.) 2003. Fisiología Médica: El Manual Moderno.
8. Stellar, E. 1954. The physiology of motivation. Psychol Rev, 61, 5-22.
9. González M.E., Ambrosio K. G. & Sánchez S. Regulación neuroendocrina del hambre, la saciedad y el mantenimiento del balance energético. Inv Salud. 2006; 8(003); 191-200
10. Murillo E., Rodríguez C. E., Arias O. & Pacheco E. Moléculas cerebrales y apetito. Rev. Ciencia. 2012; 63(1); 52-57.
11. Zambrano, E., Martinez-Samayoa, P. M., Rodriguez-Gonzalez, G. L. & Nathanielsz, P. W. 2010. Dietary intervention prior to pregnancy reverses metabolic programming in male offspring of obese rats. J Physiol, 588, 1791-9
12. Claudia J. Bautista, Paola Martínez Samayoa, Elena Zambrano. Obesidad Materna: Consecuencias sobre el Metabolismo de la Progenie. Rev. Esc. Med. Dr. J. Sierra. 2009; 23(2).

13. Sullivan, E. L., Smith, M. S., Grove, K. L., 2011. Perinatal exposure to high-fat diet programs energy balance, metabolism and behavior in adulthood. *Neuroendocrinology* 93, 1-8.
14. Toi, E., Shaikh, H., Robinson, S. Teoh, T. G., 2010. Obesity in pregnancy: a major healthcare issue. *Postgrad. Med. J.* 86, 617-623.
15. Atalah, E. and R. Castro, [Maternal obesity and reproductive risk]. *Rev Med Chil*, 2004. 132(8): p. 923-30.
16. Satpathy, H.K., et al., Maternal obesity and pregnancy. *PostgradMed*, 2008. 120(3): p. E01-9.
17. Guyton, A. C. 1992. *Human physiology and mechanisms of disease*, Philadelphia; London, Saunders.
18. Cunningham, F. G. & Williams, J. W. 2005. *Williams obstetrics*, New York, McGraw-Hill Professional.
19. Ota, K. & Yokoyama, A. 1967. Body weight and food consumption of lactating rats nursing various sizes of litters. *J Endocrinol*, 38, 263-8.
20. Naismith, D. J., Richardson, D. P. & Pritchard, A. E. 1982. The utilization of protein and energy during lactation in the rat, with particular regard to the use of fat accumulated in pregnancy. *Br J Nutr*, 48, 433-41.
21. Grigor, M. R., Allan, J., Carne, A., Carrington, J. M. & Geursen, A. 1986. Milk composition of rats feeding restricted litters. *Biochem J*, 233, 917-9.
22. Del Prado, M., Villalpando, S. Gordillo, J. & Hernandez-Montes, H. 1999. A high dietary lipid intake during pregnancy and lactation enhances mammary gland lipid uptake and lipoprotein lipase activity in rats. *J Nutr*, 129, 1574-8.
23. Connor, W. E., Lowensohn, R. & Hatcher, L. 1996. Increased docosahexaenoic acid levels in human newborn infants by administration of sardines and fish oil during pregnancy. *Lipids*, 31 Suppl, S183-7.
24. Insull, W., JR. & Ahrens, E. H., JR. 1959. The fatty acids of human milk from mothers on diets taken ad libitum. *Biochem J*, 72, 27-33.
25. Brown, J. E. 2005. *Nutrition through the life cycle*, Australia ; Belmont, CA, Thomson/Wadsworth.

- 26.Owen, C. G., Whincup, P. H., Odoki, K., Gilg, J. A. & Cook, D. G. 2002. Infant feeding and blood cholesterol: a study in adolescents and a systematic review. *Pediatrics*, 110, 597-608.
- 27.Zambrano, E. 2009. [The transgenerational mechanisms in developmental programming of metabolic diseases]. *Rev Invest Clin*, 61, 41-52.
- 28.Gluckman PD. Nutrition, glucocorticoids, birth size, and adult disease. *Endocrinology* 2001; 142 (5): 1689-91.
- 29.Godfrey KM, Barker DJ. Fetal programming and adult health. *Public Health Nutr* 2001; 4: 611-24.
- 30.Guzmán C, Cabrera R, Cárdenas M, Zambrano E. Protein restriction during fetal and neonatal development in the rat alters reproductive function and accelerates reproductive ageing in female progeny. *The Journal Physiology*. 2006; 97–108.
- 31.Zambrano, E., et al., A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. *J Physiol*, 2006. 571(Pt 1): p. 221-30.
- 32.Zambrano, E., et al., Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *J Physiol*, 2005. 566(Pt 1): p. 225-36.
- 33.Desai, M., et al., Adult glucose and lipid metabolism may be programmed during fetal life. *Biochem Soc Trans*, 1995. 23(2): p. 331-5.
- 34.Armitage JA, Taylor PD, Poston L. Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy rich diet during development. *J Physiol* 2005; 565: 3-8.
- 35.Armitage JA, Gupta S, Wood C, Jensen RI, Samuelsson AM, Fuller W, et al. Developmental origins of obesity. *Front Horm Res* 2008; 36: 73-84.
- 36.Debele D. The predisposition to obesity and diabetes in offspring of diabetic mothers. *Diabetes Care* 2007; 30: 169-74.

37. Samuelsson AM, Matthews PA, Argenton M, Christie MR, McConnell JM, Jansen EH, et al. Diet- induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. *Hypertension* 2008; 51 (2): 383-92.
38. Pilnik S. El concepto de alostasis: un paso más allá del estrés y la homeostasis. *Rev. Hosp. Ital. B. Aires.* 2010; 30(1); 7-12.
39. Selye H. Stress and the general adaptation syndrome. *British Medical Journal.* 1950; 4667: 1383-92.
40. Velázquez Moctezuma, J. 2001. *Biología de la reproducción II*, México, UAM-PUIS.
41. Tsankova N, Renthal W, Kumar A, Nestler EJ. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci.* 2007.
42. Darnaudéry M, Perez-Martin M, Belizaire G, Maccari S, Garcia-Segura LM. Insulin-like growth factor 1 reduces age-related disorders induced by prenatal stress in female rats. *Neurobiol Aging.* 2006.
43. Weaver, I. C. et al. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature Neurosci.* 2004.
44. Meaney, M. J. & Szyf, M. Maternal care as a model for experience dependent chromatin plasticity? *Trends Neurosci.* 2005.
45. Seckl JR. Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *Eur J Endocrinol.* 2004.
46. Maccari S, Morley-Fletcher S. Effects of prenatal restraint stress on the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and related behavioural and neurobiological alterations. *Psychoneuroendocrinology.* 2007.
47. Weinstock M. Gender differences in the effects of prenatal stress on brain development and behavior. *Neurochem Res.* 2007.
48. Weinstock M. The potential influence of maternal stress hormones on development and mental health of the offspring. *Brain Behav Immun.* 2005.
49. Sarkar P, Bergman K, O'Connor T. G and V. Glover. Maternal Antenatal Anxiety and Amniotic Fluid Cortisol and Testosterone: Possible Implications for Foetal Programming. *Journal of Neuroendocrinology.* 2008.

50. Mairesse J, Lesage, Christophe Breton, Bernadette Bréant, Tom Hanh, Muriel Darnaudéry, Suzanne L. Dickson, Jonathan Seckl, Bertrand Blondeau, Dibier Vieau, Stefania Maccari, and Odile Viltart. Maternal stress alters endocrine function of the feto-placenta unit in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007.
51. Louvart H, Maccari S, Darnaudery M, Prenatal stress affects behavioral reactivity to an intense stress in adult female rats. *Brain Res.* 2005.
52. Viltart O, Mairesse J, Darnaudéry M, Louvart H, Vanbesien-Mailliot C, Catalani A, Maccari S. Prenatal stress alters Fos protein expression in hippocampus and locus coeruleus stress-related brain structures. *Psychoneuroendocrinology.* 2006.
53. Peter J. Morgane, Robert Austin-LaFrance, Joseph Bronzino, John Tonkiss, Sofia Díaz-Cintra, L. Cintra, Tom Kemper, Janina R. Galler. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.* 1993.
54. Weinstock M. Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behavior of the offspring. *Progress in Neurobiology.* 2001.
55. James P. Lister, Gene J. Blatt, William A. DeBassio, Thomas L. Kemper, John Tonkiss, Janina R. Galler, Douglas L. Rosene. Effect of prenatal protein malnutrition on numbers of neurons in the principal cell layer of the adult rat hippocampal formation. 2005
56. Ramos, A., 2008. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? *Trends Pharmacol. Sci.* 29, 493-498.
57. Ramos, A., Pereira, E., Martins, G. C., Wehrmeister, T. D., Izidio, G. S., 2008. Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial. *Behav. Brain Res.* 193, 277-288.
58. Redolar Ripoll D. *Cerebro y adicción.* Barcelona: Editorial UOC, 2008.
59. Rodgers RJ, Dalvi A. 1997. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neuroscience and Biobehavioral Rev,* 6: 801-810.

60. Gluck M. A., Mercado E., Myers C. E. Aprendizaje y memoria. Del cerebro al comportamiento. México: McGraw-Hill, 2009.
61. Ortega LC, Franco JC. Neurofisiología del aprendizaje y la memoria. Plasticidad Neural. Archivos de la medicina, 2010, 1; 6.
62. Marina JA. Memoria y aprendizaje. Pediatr Integral. 2011,XV (10):978-980.
63. Lombroso P. Learning and memory. Rev Bras Psiquiatr 2004; 26 (3) 207-10.
64. Weiss RP. Memory and learning. Training & development; 2000, 54 (10): 46-51.
65. Manchado CS. Portella CE, Silvia JG, Velasques B, Bastes VH, Cunha M, Basile L, Cagy M, Predade RA, Ribeiro P. Aprendizaje y memoria implícita: mecanismos y neuroplasticidad. Rev Neurol 2008, 46: 543-91.
66. Habib M. 1994. Bases neurológicas de las conductas. Ed Masson.
67. Reeves, P. G., Nielsen, F. H. & Fahey, G. C., JR. 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J Nutr, 123, 1939-51.
68. Stunkard, A. J. & Wadden, T. A. 1993. Obesity: theory and therapy, New York, Raven Press.
69. Bautista-Carbajal, C. J & Zambrano, E. 2010. Maternal obesity (MO) produces marked changes in milk composition which are variably reversed by dietary interventions. Datos enviado para la Annual Meeting of the Society for Gynecologic Investigation (SGI) del 16 al 19 de marzo de 2011 en Miami, Florida. Mexico DF.: INCMNSZ.
70. Teegarden, S. L., Scott, A. N. & Bale, T. L., 2009. Early life exposure to a high fat diet promotes long-term changes in dietary preferences and central reward signaling. Neuroscience, 162, 924-32.
71. Tozuka, Y., Kumon, M., Wada, E., Onodera, M., Mochizuki, H., Wada, K., 2010. Maternal obesity impairs hippocampal BDNF production and spatial learning performance in young mouse offspring. Neurochem. Int. 57, 235–247.

72. Tozuka, Y., Wada, E., Wada, K., 2009. Diet-induced Obesity in female to peroxidized lipid accumulations and impairment of hippocampal neurogenesis during the early life of their offspring. *FASEB J.* 23, 1920–1934.
73. Antonow-Shlorke, I., Kuhn, B., Muller, T., Schubert, H., Sliwka, U., Nathanielsz, P. W., Schwab, M., 2001. Antenatal betamethasone treatment reduces synaptophysin immunoreactivity in presynaptic terminals in the fetal sheep brain. *Neurosci. Lett.* 297, 147-150.
74. Antonow-Schlörke, I., Schwab, M., Li, C., Nathanielsz, P.W., 2003. Glucocorticoid exposure at the dose used clinically alters cytoskeletal proteins and presynaptic terminals in the fetal baboon brain. *J. Physiol.* 547, 117–123.

Apéndice

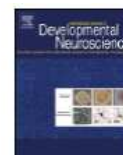
Artículo presentando los resultados de las crías machos en International Journal of Developmental Neuroscience Volumen 30, Número 2, Abril 2012, Páginas 75–81



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

International Journal of Developmental Neuroscience

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijdevneu



Maternal obesity in the rat programs male offspring exploratory, learning and motivation behavior: prevention by dietary intervention pre-gestation or in gestation

J.S. Rodríguez^b, G.L. Rodríguez-González^a, L.A. Reyes-Castro^a, C. Ibáñez^a, A. Ramírez^a, R. Chavira^a, F. Larrea^a, P.W. Nathanielsz^b, E. Zambrano^{a,*}

^a Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México City 14000, México

^b Center for Pregnancy and Newborn Research, Department of Obstetrics and Gynecology, University of Texas Health Sciences Center, San Antonio, TX 78229, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 August 2011

Received in revised form

16 December 2011

Accepted 28 December 2011

Keywords:

Developmental programming

Cognition

Stress response

Consummatory behavior

Corticosterone

ABSTRACT

We studied the effects of maternal high fat diet (HFD, 25% calories from fat administered before and during pregnancy and lactation) and dietary intervention (switching dams from HFD to control diet) at different periconceptional periods on male offspring anxiety related behavior, exploration, learning, and motivation. From weaning at postnatal day (PND) 21, female subjects produced to be the mothers in the study received either control diet (CTR – 5% calories from fat), HFD through pregnancy and lactation (MO), HFD during PNDs 21–90 followed by CTR diet (pre-gestation (PG) intervention) or HFD from PND 21 to 120 followed by CTR diet (gestation and lactation (G) intervention) and bred at PND 120. At 19 days of gestation maternal serum corticosterone was increased in MO and the PG and G dams showed partial recovery with intermediate levels. In offspring, no effects were found in the elevated plus maze test. In the open field test, MO and G offspring showed increase zone entries, displaying less thigmotaxis; PG offspring showed partial recuperation of this behavior. During initial operant conditioning MO, PG and G offspring displayed decreased approach behavior with subsequent learning impairment during the acquisition of FR-1 and FR-5 operant conditioning for sucrose reinforcement. Motivation during the progressive ratio test increased in MO offspring; PG and G intervention recuperated this behavior. We conclude that dietary intervention can reverse negative effects of maternal HFD and offspring outcomes are potentially due to elevated maternal corticosterone.

© 2012 ISDN. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Maternal obesity negatively influences maternal, fetal and offspring life-time phenotype including unwanted effects on offspring brain development, behavior, affect and cognition [for review see (Sullivan et al., 2011; Tsoi et al., 2010)]. One prospective clinical study of maternal obesity outcomes reported high inattention scores and a two-fold increase in risk of difficulties with emotional regulation in 5-year-old children (Rodríguez, 2010). In animal models, maternal obesity causes brain developmental abnormalities in offspring hypothalamic and hippocampal areas, and in the serotonergic, dopaminergic and opioid systems which result in increased anxiety, impairment in spatial learning and memory and desensitization of the reward system (Bilbo and Tsang, 2010; Bouret, 2010b; Naef et al., 2008, 2011; Naef and Woodside, 2007; Sullivan et al.,

2010; Tozuka et al., 2010; Vucetic et al., 2010; Walker et al., 2008; Wright et al., 2011). Since controlled, experimental dietary manipulation combined with the required intensive behavioral testing of offspring is not possible in humans, it is necessary to use animal models to examine the effects of specific models of maternal over nutrition with and without dietary intervention on offspring development and behavior.

Human epidemiological (Dabelea, 2007; Solomons, 2009; Wadhwa et al., 2009) and animal studies (Bautista et al., 2008; Bouret, 2010a; Han et al., 2004; Nijland et al., 2008; Nuyt and Alexander, 2009; Symonds et al., 2009; Taylor and Poston, 2007; Warner and Ozanne, 2010) demonstrate that the periconceptional, fetal and early post-natal nutritional environments modify the development of offspring physiological systems including cardiovascular, metabolic and endocrine function. These observations have led to the concept of a nutritional basis for the developmental origins of adult disease (Armitage et al., 2004; Warner and Ozanne, 2010). Developmental programming of offspring resulting in metabolic disorders or obesity can occur following either maternal under-nutrition (da Silva et al., 2011; Desai et al., 2007; Hyatt

* Corresponding author. Tel.: +52 55 5487 0900x2417; fax: +52 55 5655 9859.
E-mail address: zamgon@unam.mx (E. Zambrano).

et al., 2011; Sebert et al., 2010; Zambrano et al., 2006) or over-nutrition (Bayol et al., 2010; Wright et al., 2011; Zambrano et al., 2010). We have recently reported developmental programming effects of pre and/or postnatal protein restriction in rat offspring showing reduced motivation, impaired learning and decreased thigmotaxis at adult age (Reyes-Castro et al., 2011a,b; Torres et al., 2010). However, there are few data on the developmental programming effects of maternal obesity and accompanying excess nutrient intake which are becoming major concerns since more than 60% of childbearing age women in developed countries are overweight (King, 2006).

We recently reported on the potential of dietary intervention to modify offspring metabolic outcomes resulting from maternal obesity and HFD prior to pregnancy (Zambrano et al., 2010). In the present study we wished to determine if dietary intervention, i.e. returning the dam from a HFD to a normal diet, at different periconceptional periods would influence offspring behavioral effects. We hypothesized that in male offspring (1) maternal HFD would negatively impact aspects of anxiety related behavior, exploration, learning and motivation behaviors and (2) dietary intervention would ameliorate some of these negative outcomes in a manner dependent on the timing of the dietary recuperation. Four groups of weanling female rats were administered either control diet (CTR – 5% calories from fat), a high fat diet (HFD – 25% calories from fat) from postnatal day (PND) 21 through pregnancy and lactation (MO group), the HFD during PND's 21–90 followed by CTR diet during pregnancy and lactation (pre-gestation (PG) dietary intervention group) and the HFD from PND 21 to 120 followed by CTR diet during pregnancy and lactation (gestation (G) dietary intervention group). Male offspring behavior was assessed to determine HFD effects on anxiety, exploration, learning, and motivation and offspring improvement by maternal dietary intervention.

2. Methods

2.1. Animal care and use

2.1.1. Subjects used to produce the dams for the pregnancies studied

Female albino Wistar rats were born and maintained in the colony of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ), Mexico City, Mexico; an Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) International accredited facility. All procedures were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the INNSZ, Mexico City, Mexico. Subjects were housed in a light-controlled environment (lights on from 07:00 to 19:00 h at 22–23°C) and fed normal laboratory chow (Zeigler Rodent RQ 22-5, USA) containing 22.0% protein, 5.0% fat, 31.0% polysaccharide, 31.0% simple sugars, 4.0% fiber, 6.0% minerals and 1.0% vitamins (w/w), energy 4.0 kcal g⁻¹ (0.2 kcal g⁻¹ from fat). Between 14 and 16 weeks of age (average weight 220 ± 20 g), females were bred with a non-litter mate proven male breeder. Dams delivered naturally at term and on postnatal day 2 litters were culled to 10 pups maintaining as near a 1:1 ratio of males and females.

2.2. Experimental dams

At weaning (PND 21), the prospective mothers were randomly assigned to either a control (CTR; *n* = 12) diet that received laboratory chow or a maternal obesity diet (MO; *n* = 36) – a high fat diet containing 23.5% protein, 20.0% animal lard, 5.0% fat, 20.2% polysaccharide, 20.2% simple sugars, 5.0% fiber, 5.0% mineral mix, 1.0% vitamin mix (w/w), energy 4.9 kcal g⁻¹ (1.23 kcal g⁻¹ from animal lard and fat). Only one female from any one litter was assigned to a group. At PND 90, 1 month before breeding, 12 MO females were assigned at random to the dietary intervention (DINT) pre-gestation group and placed back on CTR diet for the rest of the study, i.e. before and during pregnancy and lactation. At PND 120 all groups were bred and the day spermatozoa were present in a vaginal smear designated as day of conception. At this time 12 MO females were assigned at random to the DINT group during gestation (G) and switched to CTR diet for the rest of the study, i.e. pregnancy and lactation. The other 3 groups were fed their pre-pregnancy diet throughout pregnancy and lactation (see Table 1 for groups). At 19 days of gestation 6 dams from each of the 4 groups were euthanized to collect serum for corticosterone measurements. All remaining dams (6 per group) delivered spontaneously. The day of delivery was considered as PND 0. Food and water were available *ad libitum*. Pregnant and lactating rats were weighed every day through pregnancy and until pups were removed at weaning.

2.3. Maintenance of offspring

Litter size and pup weight were recorded at birth. Ano-genital distance, anterior–posterior abdominal distance and head diameter were measured with calipers. Our published data indicate that ano-genital distance is 1.67 ± 0.13 mm (*n* = 291 pups from 43 litters; mean ± SEM) in female pups and 3.26 ± 0.22 mm (*n* = 252 pups from 43 litters) in males at birth (Zambrano et al., 2005a). Since a value of 2.5 mm is more than 2 SDs from the mean of either group, sex was judged according to whether the ano-genital distance was >2.5 mm for males. To ensure homogeneity of offspring evaluated, all litters studied were adjusted to 10 pups per dam. The sex ratio was maintained as close to 1:1 as possible. Pups continued to be weighed every week.

2.4. Elevated plus maze (EPM)/open field

Two weeks prior to all behavioral testing, a reverse light cycle was implemented (lights off at 7 a.m. and on at 7 p.m.) with testing occurring during the dark phase. Subjects were assessed 7 days a week at the same time of the dark cycle for each subject between 8 a.m. and 4 p.m. At PND 75 six male unrelated naïve subjects per treatment group were tested. The specifications of data collection, the EPM and the open field apparatus have been described in detail (Reyes-Castro et al., 2011a).

2.5. Operant conditioning

On PND 80 six unrelated male offspring from different litters per diet group were tested in operant chambers (E10-10TC, Coulbourn-Instruments, PA, USA) as previously described (Reyes-Castro et al., 2011b). Two weeks prior to onset of operant training offspring were placed on water deprivation for 23 h/day with 1 h of free access. This continued throughout training and testing with the 1 h of free access immediately following behavioral sessions. For each trial the lever was extended until pressed, after which the subject was allowed 120 s to approach the reward magazine and respond with a nose poke. The registration of the nose poke into the reward magazine by the photocell receptors started the feeding for 10 s. Each trial was followed by an inter-trial interval of 5 s during which the lever was retracted. FR-1 conditioning was complete when subjects earned 20 reinforcements during a 15-min session. After all subjects reached this criterion, they were introduced to a FR-5 schedule with the identical performance criteria as for the FR-1 schedule albeit with 5 responses required per trial.

2.6. Progressive ratio testing

Following operant conditioning, each subject commenced progressive ratio testing for 10 days. In the progressive ratio schedule, an additional lever press is required for all subsequent reinforcements for the first eight reinforcements (progressive ratio + 1). For instance, one press for the first reinforcement and four presses for the fourth reinforcement. Following every eighth reinforcement, the response increment doubles and hence the number of lever presses required to obtain successive sucrose reinforcements was as followed: progressive ratio + 1 = 1, 2, ..., 8; progressive ratio + 2 = 10, 12, ..., 24; progressive ratio + 4 = 28, 32, ..., 56; progressive ratio + 8 = 64, 72, ..., 120; progressive ratio + 16 = 136, 152, ... etc. Progressive ratio sessions were 30 min in length.

2.7. Free sucrose consumption

To assess sucrose consumption behavior, subjects were given direct access to bottled sucrose solution (7%) for 30 min in the familiar colony room 1 day after the last progressive ratio session. For this evaluation subjects were single caged and sucrose consumption was calculated by subtraction of the bottle weight at the end of the session from the initial weight. This procedure was performed on 3 consecutive days.

2.8. Corticosterone measurements

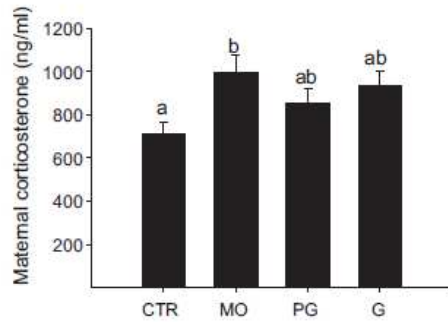
In dams at 19 days of gestation and in the male offspring on PND 110, subjects were sacrificed by decapitation and blood samples taken from the neck to determine corticosterone serum levels. Blood samples were centrifuged at 4°C for 15 min at 3500 rpm to remove red blood cells and serum stored at –20°C until all samples were analyzed. Corticosterone serum levels were determined by radioimmunoassay using a commercial rat kit, DPC Coat-a-count (TKRC1) from Diagnostic Products (Los Angeles, CA, USA). Intra- and inter-assay variability was <6% and <7%. The kit was used in accordance with manufacturer's instructions and samples were measured in duplicate.

2.9. Statistical analyses

All data are presented as Mean ± SEM, alpha level was set at 0.05. Behavioral endpoints and corticosterone levels were analyzed by ANOVA with between-subject factor of early life manipulation (maternal diet during the different periods). Post hoc analyses were performed by Tukey test using Sigma Stat 3.5.

Table 1
Experimental groups.

Groups	Maternal diet				Offspring diet
	PND 21–90	PND 90–120	Pregnancy	Lactation	
Control (CTR)	Control	Control	Control	Control	Control
Maternal obesity (MO)	High fat	High fat	High fat	High fat	Control
Pre-gestational dietary intervention (PG)	High fat	Control	Control	Control	Control
Gestational dietary intervention (G)	High fat	High fat	Control	Control	Control

**Fig. 1.** Maternal serum corticosterone levels at 19 days gestation. Mean ± SEM, $n = 6$ dams. Data not sharing a letter are statistically different, $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Maternal corticosterone

Maternal corticosterone was higher at 19 days gestation in MO than CTR dams (Fig. 1, $p < 0.05$) with intermediate levels in the PG and G which did not reach significance.

3.2. Elevated plus maze

On PND 75 male offspring were administered the EPM to measure anxiety related behaviors. Offspring displayed no differences in the number of entries, time spent or distance traveled in the open arms, or total distance traveled (Fig. 2A–D).

3.3. Open field

Analyses of behavioral endpoints in the open field test revealed differences in experimental offspring. The MO and G offspring had increased border zone entries compared to CTR offspring (Table 2, $p < 0.05$). The G offspring had increased center zone entries versus CTR and increased center zone distance traveled compared to CTR and PG offspring (Table 2, $p < 0.05$). No differences were found for total distance, border zone time, border zone distance, and center zone time (Table 2).

3.4. Operant conditioning and progressive ratio

In offspring initial exposure to the operant chamber revealed differences in the number of sessions before approach and response to the reinforcement contingent lever. The MO, PG and G offspring required more sessions to respond versus the CTR offspring (Fig. 3A, $p < 0.05$). For fixed ratio 1 schedule of reinforcement (FR-1), group differences were determined for the number of sessions before

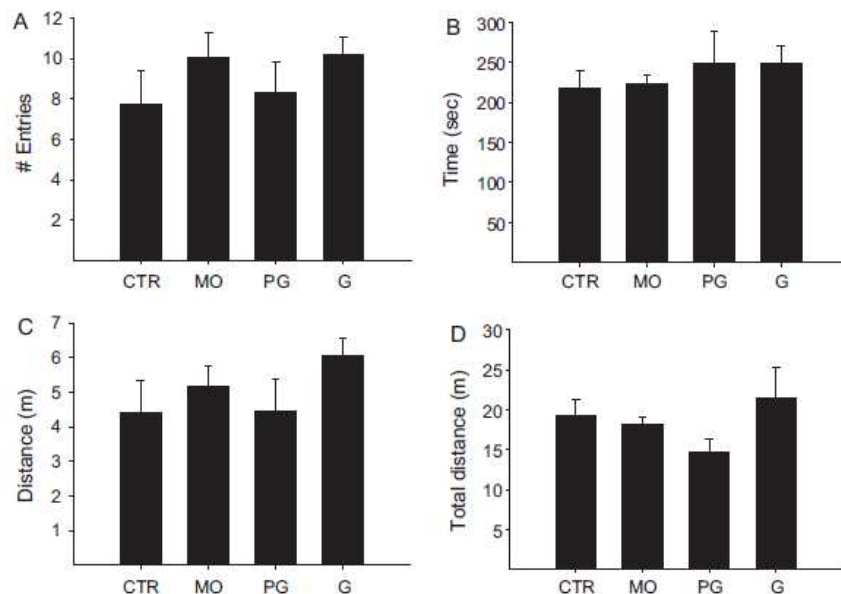
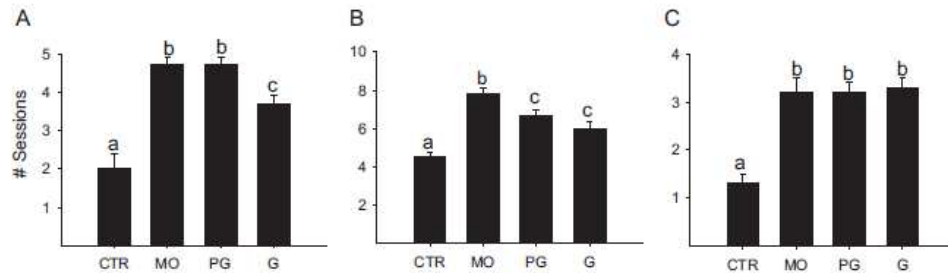
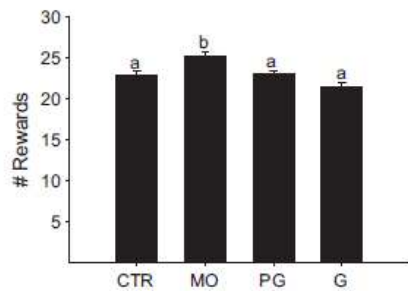
**Fig. 2.** Elevated plus maze endpoints. (A) Open arm entries, (B) open arm time (s), (C) open arm distance traveled (m), (D) total distance traveled (m). Mean ± SEM, $n = 6$ from different litter. Data not sharing a letter are statistically different, $p < 0.05$.

Table 2
Open field.

Group	Total distance	Border zone entries	Border zone time	Border zone distance	Center zone entries	Center zone time	Center zone distance
CTR	44.3 ± 4.8	12.3 ± 1.7 ^a	519 ± 45.7	39.1 ± 4.2	11.6 ± 1.9 ^a	81 ± 45.7	5.2 ± 0.9 ^a
MO	56.6 ± 10.8	22.3 ± 2.9 ^b	539 ± 6.0	48.7 ± 10.2	21.3 ± 2.9 ^{ab}	61 ± 5.9	7.9 ± 0.9 ^{ab}
PG	50.5 ± 5.0	16.3 ± 2.4 ^{ab}	547 ± 9.3	43.8 ± 4.1	15.8 ± 2.5 ^{ab}	53 ± 9.3	6.6 ± 1.2 ^a
G	48.5 ± 4.5	25 ± 6.2 ^b	461 ± 17.4	36.5 ± 3.2	25.3 ± 2.6 ^b	139 ± 17.4	12.0 ± 1.6 ^b

**Fig. 3.** (A) Number of sessions required for offspring to press the operant lever for initial positive reinforcement. (B) Number of sessions required for offspring to attain FR-1 performance criterion. (C) Number of sessions required for offspring to attain FR-5 performance criterion. Mean ± SEM, n = 6 pups. Data not sharing a letter are statistically different, $p < 0.05$.**Fig. 4.** Number of rewards received during progressive ratio sessions. Mean ± SEM, n = 6 pups. Data not sharing a letter are statistically different, $p < 0.05$.

offspring attained criterion. The MO, PG and G offspring all required more sessions to attain performance criterion with the MO group requiring the most sessions (Fig. 3B, $p < 0.05$). Fixed ratio 5 schedule of reinforcement (FR-5) shows MO, PG and G offspring all required more session to reach performance criterion versus CTR offspring (Fig. 3C, $p < 0.05$). Effects on motivation as assessed by progressive ratio tasks show increased responding in MO offspring compared to CTR, PG and G groups (Fig. 4, $p < 0.05$).

3.5. Free sucrose consumption

No overall treatment effect was determined for free access to 7% sucrose during three 30 min sessions (Table 3).

3.6. Offspring corticosterone

Corticosterone male serum levels were measured on PND 110. The MO offspring show decreased corticosterone levels compared

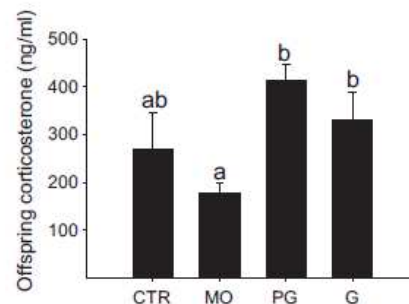
Table 3
7% sucrose consumption during 30 min (average of 3 days).

	CTR	MO	PG	G	ANOVA
(ml)	18.4 ± 0.3	17.3 ± 0.3	18.5 ± 0.3	18.0 ± 0.3	$P = 0.051$

to the PG and G offspring but not versus CTR offspring (Fig. 5, $p < 0.05$).

4. Discussion

Developmental exposure to environmental challenges in offspring can influence various aspects of behavior. In a model of maternal obesity in the rat (Zambrano et al., 2010), we sought to determine the behavioral effects in male offspring born to dams administered a HFD from PND 21 through pregnancy and lactation (maternal obesity, MO group), HFD from PND 21 to 90 and switched to control diet 1 month before mating and during pregnancy and lactation (pre-gestation dietary intervention, PG group) and from PND 21 to 120 but not during pregnancy and lactation (gestational dietary intervention, G group). The different windows of HFD regimens administered produced physiological differences in the mothers (Zambrano et al., 2010), of particular importance, maternal corticosterone serum levels at 19 days of gestation were increased in the MO group but to a lesser degree in the PG or G groups. Increased maternal corticosterone has been demonstrated in many situations that result in developmental programming of offspring by altered maternal nutrition and may constitute a common feature that explains some of the similarities in outcomes from

**Fig. 5.** Offspring corticosterone serum levels. Mean ± SEM, n = 6 from different litter. Data not sharing a letter are statistically different, $p < 0.05$.

different challenges (Cottrell and Seckl, 2009; Langley-Evans, 2009; Zambrano et al., 2005b; Guzman et al., 2006).

4.1. Anxiety related behavior and exploratory effects

Consistent with our findings here, anxiolytic effects in offspring following early postnatal overfeeding in male and female offspring (Spencer and Tilbrook, 2009) and following maternal HFD during lactation in male offspring have previously been reported (Wright et al., 2011). Those studies demonstrated that raising rats in small litters (Spencer and Tilbrook, 2009) or dams fed a cafeteria diet during pre-gestation, gestation and/or lactation (Wright et al., 2011) induces obesity in offspring and reduces anxiety in the EPM and the open field. Additionally, chronic consumption of a HFD during pregnancy causes perturbations in the serotonergic system, such as increased expression of tryptophan hydroxylase 2 and serotonin 1A receptor in the rostral raphe nucleus, and increases anxiety-like behavior in rhesus monkey offspring (Sullivan et al., 2010).

In this study the anxiolytic effects were not apparent in the experimental offspring during EPM but were observed during the open field test. These inconsistent behavioral responses in the EPM and open field tests are not surprising since studies indicate that behavioral tests that rely on unconditioned responses assess different aspects of affect and that emotional reactivity is multidimensional (Ramos, 2008; Ramos et al., 2008; Trullas and Skolnick, 1993; Vendruscolo et al., 2003). A current review contends that the EPM, open field apparatus and the light/dark box tests should be administered concomitantly to more adequately assess affect since time and/or sequence of test administration can influence outcomes (Ramos, 2008). One potential effect of testing sequentially across days is that effects are reduced as testing progresses (Ramos, 2008). However, here we report negative results in the first task administered (EPM) and positive results in the subsequent task (open field) which makes the preceding argument less likely. Alternatively, inconsistent results obtained across tests may be due to construct differences between tests or to uncontrolled, intra-individual fluctuations in behavior (Ramos, 2008).

4.2. Learning effects

During FR-1 and FR-5 operant conditioning MO, PG and G offspring displayed impaired learning. So in experimental offspring, maternal dietary intervention did not prevent these particular cognitive deficiencies. In support of our findings in the MO group, previous studies report hippocampal brain derived neurotrophic factor is decreased along with hippocampal neurogenesis and impairment in spatial learning in mice offspring exposed to a HFD during pregnancy and lactation (Tozuka et al., 2009, 2010). It should be noted that maternal dietary intervention at either period, 1 month before pregnancy or at the beginning of pregnancy, did not prevent learning impairment suggesting that maternal diet long-term prior to conception is critical for male development.

We have previously measured elevated corticosterone, estradiol, testosterone (Zambrano et al., 2005b) and progesterone (Guzman et al., 2006), concentrations near term (19 days gestation) in prenatal protein restricted rat dams with subsequent cognitive impairment in offspring (Reyes-Castro et al., 2011b, 2012). In the present study maternal corticosterone levels were increased in MO dams and marginally, though not significantly, increased in the PG and G dams. Maternal steroids can cross the placenta, and such exposure to transplacentally acquired androgens and glucocorticoids in fetal life can result in developmental perturbations which could have a role in the current behavioral findings since human studies report impairment of spatial learning ability in males exposed to excess levels of androgens *in utero* (Meyer-Bahlburg, 2011; Puts et al., 2008). There is also abundant

evidence of excess levels of glucocorticoids *in utero* impairing brain development and later behavior in humans and animal models (Antonow-Schlorke et al., 2001, 2003; French et al., 2004; Johnson et al., 1981; Karemaker et al., 2006, 2008; Matthews, 2001; Rodríguez et al., 2011; Seckl, 2008; Szuran et al., 2000; Uno et al., 1990, 1994; Weinstock, 2008) which could explain the cognitive deficits demonstrated in this study.

4.3. Motivation effects

During motivation assessment, MO offspring display increased motivation. In this context, dietary intervention normalized motivation in male PG and G offspring. The increased motivation displayed by the MO offspring is consistent with models showing increased appetitive and/or consummatory drive following maternal or early life over nutrition (Chang et al., 2008; Desai et al., 2007; Sebert et al., 2009). Similar to the MO offspring outcomes in this study, rats born to dams fed a junk food diet during gestation and lactation develop hyperphagia and a preference for fatty, sugary and salty foods over protein-rich foods compared to offspring fed a balanced chow diet prior to weaning or during lactation alone (Bayol et al., 2008). In the present study, effects of maternal HFD on offspring sucrose consumption behavior were measured there was no overall effect of perinatal diet, so the influence of consummatory behavior on progressive ratio (motivation) behavior is not applicable.

5. Conclusions

Maternal HFD administration produces an altered behavioral phenotype in male offspring. Dietary intervention recuperated or ameliorated certain indices in dams and offspring. In dams, corticosterone levels were reduced in the PG and G groups to between CTR and MO levels. However effects on offspring learning could still have been affected by the increased levels of maternal prenatal corticosterone as all experimental offspring displayed learning impairment. Prenatal exposure to increased levels of glucocorticoids changes hypothalamic pituitary adrenal axis function as well as associated receptors expression levels [for review see (Kapoor et al., 2008)]. Normal levels of motivation were restored by PG and G intervention. Additionally during exploratory behaviors, PG intervention prevented the increased exploration behavior displayed by the MO and G offspring in the open field. These findings show the importance of optimizing maternal diet and avoiding the complication of obesity. It also holds out the hope that recuperation of the diet prior to pregnancy can have beneficial long-term effects.

Acknowledgements

L.A. Reyes-Castro and G.L. Rodríguez-González are graduate students from Doctorado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México and are recipients of CONACyT fellowship. This work was supported by Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT 155166), México and NIH HD 21350.

References

- Antonow-Schlorke, I., Kuhn, B., Muller, T., Schubert, H., Sliwka, U., Nathanielsz, P.W., Schwab, M., 2001. Antenatal betamethasone treatment reduces synaptophysin immunoreactivity in presynaptic terminals in the fetal sheep brain. *Neurosci. Lett.* 297, 147–150.
- Antonow-Schlorke, I., Schwab, M., Li, C., Nathanielsz, P.W., 2003. Glucocorticoid exposure at the dose used clinically alters cytoskeletal proteins and presynaptic terminals in the fetal baboon brain. *J. Physiol.* 547, 117–123.
- Armitage, J.A., Khan, I.Y., Taylor, P.D., Nathanielsz, P.W., Poston, L., 2004. Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional

- Walker, C.D., Naef, L., d'Asti, E., Long, H., Xu, Z., Moreau, A., Azeddine, B., 2008. Perinatal maternal fat intake affects metabolism and hippocampal function in the offspring: a potential role for leptin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1144, 189–202.
- Warner, M.J., Ozanne, S.E., 2010. Mechanisms involved in the developmental programming of adulthood disease. *Biochem. J.* 427, 333–347.
- Weinstock, M., 2008. The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32, 1073–1086.
- Wright, T., Langley-Evans, S.C., Voigt, J.P., 2011. The impact of maternal cafeteria diet on anxiety-related behaviour and exploration in the offspring. *Physiol. Behav.* 103, 164–172.
- Zambrano, E., Bautista, C.J., Deas, M., Martinez-Samayoa, P.M., Gonzalez-Zamorano, M., Ledesma, H., Morales, J., Larrea, F., Nathanielsz, P.W., 2006. A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. *J. Physiol.* 571, 221–230.
- Zambrano, E., Martinez-Samayoa, P.M., Bautista, C.J., Deas, M., Guillen, L., Rodriguez-Gonzalez, G.L., Guzman, C., Larrea, F., Nathanielsz, P.W., 2005a. Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *J. Physiol.* 566, 225–236.
- Zambrano, E., Martinez-Samayoa, P.M., Rodriguez-Gonzalez, G.L., Nathanielsz, P.W., 2010. Dietary intervention prior to pregnancy reverses metabolic programming in male offspring of obese rats. *J. Physiol.* 588, 1791–1799.
- Zambrano, E., Rodriguez-Gonzalez, G.L., Guzman, C., Garcia-Becerra, R., Boeck, L., Diaz, L., Menjivar, M., Larrea, F., Nathanielsz, P.W., 2005b. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J. Physiol.* 563, 275–284.