

NIVEL Y PATRÓN DE EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ADIPONECTINA-2 EN LA PLACENTA DE BIOMODELOS OBESOS

Laura Camila Chávez Sierra

Universidad del Valle, Apartado Aéreo 25360, Cali, Colombia

laura.chavez@correounivalle.edu.co

Programa de Biología, sede Cali

Andrea Niño

Universidad del Valle, Apartado Aéreo 25360, Cali, Colombia

andrea.nino@correounivalle.edu.co

Carolina Pustovrh

Universidad del Valle, Apartado Aéreo 25360, Cali, Colombia

maria.pustovrh@correounivalle.edu.co

RESUMEN

La obesidad gestacional se ha asociado con múltiples complicaciones tanto para la salud materna como para la salud fetal. Se ha propuesto que uno de los vínculos entre la obesidad y las complicaciones observadas en la gestación es la distorsión de la actividad endocrina del tejido adiposo. Particularmente, la adiponectina sufre una disminución abrupta y significativamente mayor durante la gestación en condiciones de obesidad. Esta adipoquina no cruza la barrera placentaria por lo que sus efectos en la placenta estarían mediados por sus receptores Adipor1 y Adipor2. Este estudio, se propuso establecer si existen alteraciones en el nivel y el patrón de expresión del receptor de adiponectina 2 (Adipor2) en la placenta de biomodelos obesos a 12,5 días de gestación. Los resultados mostraron que la adiponectina en plasma es significativamente menor en biomodelos gestantes obesos que en sus contrapartes control. Entre tanto, el receptor Adipor2 conserva un patrón de expresión similar en la placenta de biomodelos control y obesos. No obstante, se detectó un incremento en la inmunomarcación en la zona de unión y la decidua de la placenta, así como en el miometrio de gestantes obesas en comparación con los biomodelos control. Estos resultados podrían sugerir que existe un mecanismo de compensación que mitigaría los efectos deletéreos de la disminución drástica de la adiponectina en la gestación temprana en biomodelos gestantes obesos. Sin embargo, se requieren estudios a nivel funcional para someter a prueba esta hipótesis

Palabras clave: obesidad, gestación temprana, placenta murina, adiponectina, Adipor2.

ABSTRACT

Gestational obesity has been associated with multiple complications for both maternal and fetal health. It has been proposed that one of the links between obesity and complications observed in pregnancy is the distortion of the endocrine activity of adipose tissue. In particular, adiponectin undergoes an abrupt decrease during pregnancy in obese conditions. This adipokine does not cross the placental barrier. Hence its effects on the

placenta are mediated by its receptors: adipor1 and adipor2. This study assessed whether there are alterations in the level and pattern of expression of the adiponectin receptor 2 (Adipor2) in the placenta of obese rats at 12.5 days of gestation. The results showed that adiponectin in plasma is significantly lower in obese pregnant rats than in their control counterparts. Meanwhile, the adipor2 receptor retains a similar expression pattern in the placenta of control and obese rats. However, an increase in immunostaining was detected in the junctional area and the placenta's decidua and the myometrium of obese pregnant rats compared to the control. These results could suggest that there is a compensation mechanism that mitigates the deleterious effects of the drastic decrease in adiponectin in early gestation in obese pregnant rats. However, further studies at the functional level are required to test this hypothesis

Key words: obesity, early gestation, murine placenta, adiponectin, Adipor2

INTRODUCCIÓN

La obesidad es una enfermedad causada por una acumulación excesiva de tejido adiposo en la que los individuos alcanzan un índice de masa corporal (IMC) igual o superior a 30 kg/m². En las últimas cuatro décadas la obesidad ha triplicado su incidencia, al punto que para el año 2016 el 13% de la población mundial adulta padecía esta enfermedad (WHO, 2018). La obesidad tiene una prevalencia más alta en mujeres que en hombres, por lo que se estima que entre el 10% y el 30% de las mujeres en edad reproductiva iniciarán la gestación en condiciones de obesidad (Hillemeier *et al.*, 2011; Zera, McGirr and Oken, 2011; Mayorga *et al.*, 2015).

La obesidad materna tiene múltiples consecuencias tanto para la salud de la gestante, como para el feto. Entre estas se cuentan, un incremento en el riesgo de padecer diabetes gestacional, incremento en el riesgo de parto prematuro, preeclampsia, muerte fetal intrauterina y anomalías fetales (Vasudevan, Renfrew and McGuire, 2011; Gaillard *et al.*, 2013; Berti *et al.*, 2016; Poston *et al.*, 2016). Con respecto al desarrollo fetal, se han observado alteraciones del crecimiento, tales como la restricción del crecimiento intrauterino y la macrosomía fetal (Gaudet *et al.*, 2014; Mission, Marshall and Caughey, 2015; Stang and Huffman, 2016). Aunque hasta el momento no está completamente claro cómo la obesidad

desencadena las alteraciones observadas en la gestación, se ha sugerido que la distorsión en la actividad endocrina del tejido adiposo podría estar contribuyendo al desarrollo de las mismas. La adiponectina, es una adipoquina que actúa como un regulador de la sensibilidad a la insulina (Yamauchi *et al.*, 2003; Fu *et al.*, 2005; Ruan and Dong, 2016) y en contraposición a lo observado en otros tejidos, se ha sugerido que los bajos niveles de adiponectina aumentan la sensibilidad a la insulina en la placenta (Powell *et al.*, 2015).

En línea con estos resultados, en gestantes y biomodelos obesos se han correlacionado negativamente los niveles séricos de adiponectina materna con la macrosomía fetal (Jansson *et al.*, 2008; Rosario *et al.*, 2015; Qiao *et al.*, 2016). Además, en biomodelos, se ha asociado una reducción en los niveles de adiponectina durante la gestación con un incremento en la expresión de transportadores de aminoácidos y de glucosa, por lo que se ha propuesto que este sería el mecanismo que liga la obesidad con alteraciones del crecimiento fetal (Powell *et al.*, 2015). La adiponectina materna no cruza la barrera placentaria (Mazaki-Tovi *et al.*, 2007) por lo que sus efectos estarían mediados por las cascadas de señalización corriente abajo de los receptores de adiponectina 1 y 2 (Yamauchi and Kadowaki, 2013). Estos receptores han sido reportados a nivel de ARNm en placentas tanto humanas como de biomodelos (Caminos *et al.*, 2005). Sin embargo, solo el receptor 2 de adiponectina ha sido detectado a nivel de proteína en ambos casos (Weiwei *et al.*, 2009).

La evidencia sugiere que la regulación en el transporte de nutrientes a través de la placenta mediada por la adiponectina está alterada en gestantes obesas. Debido a que la adiponectina materna no cruza la placenta, es posible pensar que la expresión del receptor 2 de adiponectina podría encontrarse alterada en la placenta de biomodelos obesos. Teniendo en cuenta este hecho surge la siguiente pregunta: ¿existe una alteración en la expresión del receptor 2 de adiponectina en la placenta en biomodelos obesos? Para responder a esta pregunta en el presente estudio, se establecieron los niveles y el patrón de expresión del

receptor 2 de adiponectina (Adipor2) en la placenta de ratas Wistar con obesidad adquirida por dieta de cafetería en un estadio de gestación 12.5. Así mismo, se evaluaron los niveles de adiponectina en plasma. En todos los casos los resultados se compararon con los obtenidos para biomodelos normopeso de la misma edad gestacional.

MÉTODOS

Mantenimiento de biomodelos

Para este estudio se emplearon 20 ratas Wistar hembras de entre 10 y 12 semanas de edad, que fueron obtenidas en el Laboratorio Bioterio de la Universidad del Valle (LABBIO). Los biomodelos fueron mantenidos en jaulas con dimensiones de 26 × 22 × 47 cm (ancho, alto y profundidad, respectivamente), en condiciones ambientales de luz-oscuridad de 12 - 12 horas, temperatura entre 18 - 22 °C y humedad relativa ambiental de 45 - 74 %. Todos los procedimientos realizados en este estudio fueron revisados y avalados por el Comité de Ética de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle mediante el acta 001-019.

Inducción a la obesidad

Los biomodelos fueron pesados usando una balanza Adventurer Pro ($\pm 0,01$ g) (Ohaus, EUA) y asignados aleatoriamente a los grupos control y tratamiento. Los biomodelos del grupo control se alimentaron con la dieta estándar de gránulos del concentrado Rodent Diet 5010 (Rodent Lab Chow Purina, EUA). El grupo tratamiento, fue alimentado con una dieta de cafetería compuesta por 17 alimentos ultra procesados con contenido nutricional establecido (Apéndice 1). Estos alimentos fueron ofrecidos en grupos de tres al grupo tratamiento, asegurando una variación en la oferta. A ambos grupos se les suministró agua *ad libitum*. El peso de los biomodelos, se evaluó cada semana durante las siete semanas del régimen de alimentación. Para experimentos posteriores se incluyeron únicamente los biomodelos del

grupo control que ganaron peso de acuerdo a la curva de crecimiento establecida en el LABBIO. Para el grupo tratamiento se seleccionaron los biomodelos que mostraran una ganancia de peso superior al 20% de su peso inicial (Tejada López, Ortiz and Pustovrh, 2016).

Seguimiento del ciclo estral y establecimiento de la preñez

Posterior a las 7 semanas de alimentación, se realizó el seguimiento del ciclo estral y el establecimiento de la preñez. Diariamente, se realizó una citología por medio de frotis vaginal en fresco. Los extendidos celulares se analizaron empleando un microscopio Olympus CH2 (Olympus, Japón) a 10X. Los biomodelos en los que el frotis mostró dominancia de células epiteliales nucleadas y leucocitos en fase temprana fueron clasificados en proestro (Pustovrh 2017). Los biomodelos en proestro se aparearon con un macho adulto de aproximadamente 300 gramos. Al día siguiente, se realizó un extendido vaginal y se estableció el día 0,5 de preñez ante la presencia de espermatozoides. Las dietas asignadas a cada uno de los grupos experimentales se mantuvieron durante la preñez.

Disección y recolección de la placenta

En el estadio de gestación 12.5 los biomodelos se llevaron a punto final mediante sedación profunda por inhalación con Isoflurano USP (Baxter, EUA). Se procedió a diseccionar el útero y las implantaciones bajo el estereomicroscopio Meiji Techno RZ con cámara fotográfica acoplada Infinity (Meiji Techno, Canadá) (Tejada López, Ortiz and Pustovrh, 2016). De cada biomodelo se obtuvieron en promedio 12 placentas que fueron divididas para extracción de RNA y evaluación por inmunohistoquímica. Las muestras preservadas para extracción de RNA se almacenaron a -70 °C en amortiguador RNAlater (Sigma, EUA). Entre tanto las muestras para inmunohistoquímica fueron preservadas en formol tamponado al 10% (pH 7,0).

Recolección de sangre, evaluación de los niveles de adiponectina en plasma, perfil lipídico y glicemia

Se extrajeron las muestras de sangre directamente de la vena cava, estas se depositaron en tubos para microcentrífuga para permitir el proceso de coagulación. Posteriormente, se transfirió el plasma obtenido de cada uno de los biomodelos a tubos nuevos que fueron reservados a -20°C hasta su análisis. Los niveles de adiponectina se evaluaron empleando el kit de ELISA Rat ADP/Acrp30 (Elabscience, EUA) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Los niveles de colesterol y triglicéridos en plasma fueron evaluados por medio de los métodos enzimáticos Colestat y TG-Color GPO/PAP AA (Wiener Lab, Argentina), respectivamente. La glicemia se evaluó usando el glucómetro OneTouch Ultra (LifeScan, España).

Aislamiento de ARN

Las placentas almacenadas se dividieron en fragmentos entre 18-28 mg, que fueron homogenizados para aislar el ARN usando el E.Z.N.A.® Total RNA Kit I (Omega Bio-tek, Georgia). La concentración del RNA obtenido se cuantificó usando un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific, EUA). Además, se verificó la integridad del RNA extraído mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, a 90 V por 30 min. Para el estudio se seleccionaron únicamente las muestras con una razón de OD260/OD280 igual a 2 en las que se observaron dos bandas a 4.5 y 1.9 kb correspondientes al RNA 28S y 18S.

Síntesis de ADNc y PCR semicuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

El ADN complementario (ADNc) se sintetizó usando el kit ProtoScript First Strand cDNA (New England Biolabs, Inglaterra). Para la qRT-PCR se empleó la mezcla maestra Luna

Universal qPCR (New England Biolabs, Inglaterra). Para cada reacción se emplearon 4 µL de cDNA, 0.1 µL de la sonda SYBR Green, 0.2 µL del cebador directo, 0.2 µL de cebador reverso a una concentración de 10uM diseñado con el software Universal Probe Library de Roche (tabla 1), 0.5 µL de agua ultrapura y 5 µL de la mezcla maestra. Se empleó un equipo Bio-Rad CFX 96 (Bio-Rad, EUA), usando el siguiente programa para la amplificación: denaturación inicial a 95 °C durante 10 minutos, 40 ciclos de denaturación a 95 °C por 10 segundos, alineamiento a 60 °C por 30 segundos, extensión a 72 °C por 5 segundos y finalmente el enfriamiento a 40 °C durante 10 segundos. La expresión relativa de Adipor2 en las placentas del control normopeso y en los tratamientos obesos se normalizó empleando la expresión del gen del ARN ribosomal 18S (18S ARNr) diseñado con el software Universal Probe Library de Roche (Tabla 1). Los análisis para obtener la expresión de Adipor2 se llevaron a cabo usando el software BioRad CFX Manager (Bio-Rad, EUA).

Establecimiento de la expresión relativa de Adipor2

La expresión relativa de Adipor2 en las placentas del grupo control y el grupo obeso se calculó usando la expresión del gen 18S ARNr. Para el cálculo de los niveles de expresión se utilizó el método del $\Delta\Delta Cq$ (Livak and Schmittgen, 2001). Usando los datos de Cq se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada muestra. A continuación, se obtuvo el cálculo del ΔCq como la sustracción entre el Cq promedio de las muestras de Adipor2 y el Cq de su contraparte el gen 18S ARNr (Ecuación 1). Usando el valor obtenido se calculó el valor del ΔCq promedio control Adipor2 (Ecuación 2) Finalmente, se transformó el $\Delta\Delta Cq$ a valores relativos de expresión utilizando la ecuación $2^{-\Delta\Delta Cq}$.

$$\Delta Cq = Cq \text{ promedio}_{Adipor2} - Cq \text{ promedio}_{18S \text{ ARNr}} \quad \text{(Ecuación 1)}$$

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq \text{ promedio muestra}_{Adipor2} - \Delta Cq \text{ promedio control}_{Adipor2} \quad \text{(Ecuación 2)}$$

Histología placentaria e Inmunohistoquímica

Las placentas obtenidas se deshidrataron e incluyeron en bloques de parafina. A continuación, se procedió a realizar cortes de 4 µm de espesor en micrótopo que fueron desparafinados y sometidos a tratamiento con 4 xiloles, 3 alcoholes al 100%, 3 alcoholes al 95% y 1 alcohol al 70% durante 30 s cada uno. Un 20% de los cortes obtenidos se empleó directamente para tinción con hematoxilina eosina y ácido peryódico de Schiff (PAS), mientras que el 80% restante se reservó para análisis por inmunohistoquímica.

Para la inmunohistoquímica se realizó recuperación antigénica ácida aplicando amortiguador citrato de sodio pH 6.0, 0.1M en vaporera durante 10 minutos. Seguidamente, se realizaron 3 lavados en PBS durante 2 minutos cada uno. Se incubó con peróxido de hidrógeno durante 10 minutos en cámara húmeda, inmediatamente se realizaron 3 lavados usando PBS. Posteriormente, se incubó con solución Ultra V block (Thermo-Scientific, EUA) durante 10 minutos. Las placas se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-Adipor2 D-A-3 (Santa Cruz Biotechnology, EUA) durante 18 horas a 4°C. Para cada uno de los biomodelos tanto del grupo control normopeso como del grupo obeso, se reservaron cortes que fueron incubados con PBS con el fin de obtener controles negativos. Al término de la incubación, se realizaron tres lavados de 3 minutos cada uno, el primero con PBS-Tween (PBS-T) y dos lavados con PBS. Se incubaron las placas con el anticuerpo secundario Primary antibody amplifier Quanto en cámara húmeda durante 10 minutos (Thermo Scientific, EUA). Luego de lavar las placas como se describió previamente, se aplicó el polímero HRP Quanto (Thermo Scientific, EUA) y se incubó durante 10 minutos en cámara húmeda protegida de la luz. Luego, se realizaron dos lavados de 3 minutos cada uno, el primero con PBS-T y el segundo con PBS. Se procedió a revelar incubando con DAB (diaminobenzidina) durante 5 minutos. A continuación, se procedió a lavar con agua corriente por 2 minutos y se realizó contratinción con hematoxilina-

eosina por 2 minutos, seguido de un lavado con agua destilada. Finalmente, se deshidrataron las muestras y se realizó el montaje de las placas en medio Consul-Mount (Thermo Scientific, EUA) para observación al microscopio.

Obtención y análisis de imágenes

La observación de las muestras se realizó mediante un microscopio con cámara acoplada Leica DM750 (Leica, Alemania). Se adquirieron 80 fotografías por muestra a una magnificación de 10x para realizar la reconstrucción de la implantación placentaria. Una vez se obtuvo la reconstrucción se definieron 3 cuadrantes en la zona del laberinto, 6 en la zona de unión, 14 en la zona de la decidua y 14 en el miometrio. En los cuadrantes seleccionados en cada zona se adquirieron imágenes a 40x usando el software Leica Application Suite (LASV3.8). En total se adquirieron 1480 fotografías donde se cuantificó la densidad óptica integrada (IOD) usando el programa Image-Pro Plus.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el programa SPSS Statistics (IBM, Nueva York). Se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk y Levene. Los resultados obtenidos para la ganancia de peso, los niveles de adiponectina, colesterol y triglicéridos séricos y la expresión relativa del ARNm de Adipor2 presentaron una distribución normal como homogeneidad de varianzas, por lo que se aplicó la prueba t-student para realizar comparaciones entre el grupo control normopeso y el grupo obeso. En contraste, los resultados de la densidad óptica integrada no mostraron una distribución normal, por lo que las comparaciones entre el grupo obeso y el grupo control se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney. En todos los casos la significancia estadística se fijó a un $\alpha < 0,05$ y los resultados se presentan como el promedio $\pm$ la desviación estándar

RESULTADOS

Caracterización de los grupos experimentales

Los resultados de la ganancia de peso mostraron que los biomodelos alimentados con la dieta de cafetería durante 7 semanas presentaron una ganancia de peso 3,5 veces mayor ($28,16 \pm 4,25\%$), que la ganancia de peso registrada del grupo alimentado con dieta estándar ($8,62 \pm 4,63\%$) (prueba t, valor p: $<0,0001$) (Fig. 1a). En cuanto, a los niveles de glucosa en sangre y triglicéridos en plasma no presentaron diferencias significativas entre el control y el grupo obeso a 12,5 días de gestación (prueba t, valor-p: 0,258 y 0,219, respectivamente) (Fig. 1b-c). En contraste, el grupo control y el grupo obeso difirieron significativamente en los niveles de colesterol en plasma, puesto que en el grupo obeso el valor promedio registrado para este parámetro fue 2,4 veces superior al observado en el grupo control (prueba t, valor-p: 0,001) (Fig. 1d).

Niveles de adiponectina en plasma y ARNm del receptor Adipor2

Los niveles de adiponectina en plasma a los 12.5 dg disminuyeron en el grupo obeso en comparación con el grupo control (prueba t, valor-p: 0,028), con valores de $105,01 \pm 27,09$ y $343,41 \pm 90,09$ pg/mL, respectivamente (Fig. 2a). En cuanto a la expresión relativa de Adipor2 a nivel de ARNm en la placenta de 12.5 dg no se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales (Fig. 2b).

Histología placentaria a los 12,5 días de gestación

En la placenta murina a los 12.5 días se pueden observar las siguen zonas: (1) zona del laberinto, (2) zona de unión y (3) decidua basal. Estas zonas se encuentran dispuestas de la

siguiente forma: La zona de laberinto se encuentra hacia la cara fetal, seguida por la zona de unión que limita con la decidua, la cual está ubicada hacia la cara materna junto al miometrio (Fig. 3a).

El laberinto es la zona donde se realiza el intercambio materno-fetal, en ella se insertan y ramifican los vasos del cordón umbilical formando las vellosidades placentarias, que a su vez se rodean de las lagunas maternas con glóbulos rojos anucleados y glóbulos blancos; estos dos compartimientos se encuentran separados por tres capas de trofoblasto coriónico: la primera capa, limita con los espacios maternos y se compone de citotrofoblasto, cuyos núcleos son basófilos, ovalados con uno o dos nucléolos y citoplasma ligeramente eosinófilo, la segunda y tercera capa, está constituida por sincitiotrofoblasto basófilo con núcleos pequeños, cromatina densa, el cual recubre las células endoteliales de los capilares fetales que contienen glóbulos rojos nucleados (Fig. 3b).

La zona de unión está en el límite de la cara fetal y la cara materna, está formada principalmente por células del espongiotrofoblasto y células trofoblásticas gigantes, las primeras en dirección hacia la zona del laberinto y las segundas hacia la decidua. Las células del espongiotrofoblasto son poliédricas con citoplasma acidófilo, núcleo ovalado con presencia de dos a tres nucléolos, se encuentran agrupadas dando origen a células glucogénicas, las cuales son de tamaño variable, tienen núcleo lateral y no presentan tinción citoplasmática (Fig. 3c). Estas agrupaciones inmersas en lagunas maternas favorecen la formación de canales que llevan la sangre desde las arterias espirales hacia la zona del laberinto. Las células trofoblásticas gigantes tienen núcleo grande ovalado por endoreduplicación, nucléolos visibles y citoplasma vacuolado eosinófilo (Fig. 3d).

La decidua está formada por células deciduales y células deciduales con reservas de glucógeno, en medio de las cuales se encuentran lagunas maternas. Las células deciduales son irregulares, pequeñas, con núcleo basófilo ovalado, nucléolo visible y citoplasma eosinófilo.

Entre tanto las células deciduales con reservas de glucógeno tienen diferentes tamaños, núcleo basófilo y no presentan tinción citoplasmática (Figura 3e), estas reservas de glucógeno fueron confirmadas con la tinción de PAS (Datos no mostrados). Finalmente, en el miometrio se encuentran miocitos lisos condensados hacia la parte interna y externa de esta zona y también miocitos inmersos en tejido conectivo laxo junto con arteriolas y venas maternas (Figura 3f). En estas dos zonas se encuentran células cuya morfología es consistente con la descrita para las células *Natural killer* uterinas. Estas células presentan núcleo ovalado lateral basófilo, citoplasma con presencia de gránulos eosinófilos (Fig. 3g), con presencia de polisacáridos detectados mediante la tinción PAS (datos no mostrados).

Patrón y nivel de expresión del receptor Adipor2 en la placenta

Los análisis de la inmunohistoquímica del receptor Adipor2 mostraron un patrón de expresión similar para los biomodelos obesos y los biomodelos normopeso. En ambos casos este receptor se detectó en la zona de la decidua, la zona de unión y en el miometrio. Esta detección en la placenta fue significativamente mayor, 2,3 veces más, en los biomodelos obesos que en los normopeso (valor-p: 0,009) (Fig. 4a). En la zona de unión Adipor2 se detectó en las membranas de las células trofoblásticas gigantes y las células glicogénicas del espongiotrofoblasto. En la decidua, se detectó en células cuya morfología y ubicación, rodeando las arterias espirales, sugiere que se trata de células *Natural killer* uterinas (Fig. 4d). Aunque el patrón de expresión del receptor de Adipor2 en la placenta fue similar en los biomodelos obesos y normopeso, se observaron diferencias en la inmunorreactividad en la zona de la decidua (valor-p 0,035) y la zona de unión (valor-p 0,035) siendo significativamente mayor la densidad óptica integrada en las placentas de los biomodelos obesos (Fig. 4b). En contraste, con la zona del laberinto donde la densidad óptica integrada fue similar, en esta zona la inmunomarcación no se observó claramente en las células

placentarias, sino, que se observó un artefacto del proceso de inmunomarcación en los bordes de la interfaz materno-fetal. En el miometrio la inmunolocalización se observó en las células de músculo liso. El análisis de la densidad óptica integrada reveló que la presencia de Adipor2 fue casi 4 veces mayor en los biomodelos obesos frente a sus contrapartes normopeso ($p < 0.001$) (Fig. 4 c y d).

DISCUSIÓN

Los biomodelos alimentados con dieta de cafetería mostraron una ganancia de peso igual o superior al 20%, esta fue significativamente mayor al 8% de ganancia de peso observada en los biomodelos alimentados con la dieta control. La ganancia de peso en los biomodelos alimentados con dieta de cafetería estuvo asociada a un incremento en el colesterol en plasma, pero no a alteraciones en los niveles de triglicéridos y la glucosa en sangre. Estos hallazgos corroboran que la dieta de cafetería es un método robusto que promueve la obesidad, puesto que simula una dieta occidental en la que se estimula el consumo de alimentos densamente calóricos y altamente palatables. El consumo de estos alimentos desencadena la acumulación de tejido adiposo llevando a un incremento en la masa corporal (Sampey *et al.*, 2011).

Los hallazgos sobre los niveles de glucosa en sangre y los niveles de triglicéridos en plasma reportados en este estudio son consistentes con observaciones reportadas en biomodelos alimentados con dieta de cafetería de forma aguda. Se ha mostrado que un suministro agudo de la dieta de cafetería en biomodelos murinos no conduce a alteraciones en la homeostasis de la glucosa (Sampey *et al.*, 2011; MacEdo *et al.*, 2012; Buyukdere, Gulec and Akyol, 2019; Kendig, Westbrook and Morris, 2019) ni en los niveles de triglicéridos en plasma (Gomez-Smith *et al.*, 2016; Buyukdere, Gulec and Akyol, 2019). En cuanto a la hipercolesterolemia observada en los biomodelos, esta puede deberse a que la dieta de cafetería usada en este estudio es rica en grasas (Apéndice 1), por tanto los niveles de colesterol en sangre pueden

modificarse por medio de la vía exógena (Zeeni *et al.*, 2013). Este resultado es congruente con evidencia de otros estudios en los que se emplea dieta de cafetería como método de inducción a la obesidad (MacEdo *et al.*, 2012; Buyukdere, Gulec and Akyol, 2019).

En este estudio la adiponectina en plasma disminuyó de manera significativa en biomodelos obesos con respecto a los biomodelos control. Este resultado es coherente con la evidencia que muestra que los niveles de adiponectina sérica se correlacionan inversamente con la ganancia de peso, tanto en estado no gestacional (Furukawa *et al.*, 2004) como durante la gestación (Haghiac *et al.*, 2014; Lekva *et al.*, 2017). En línea con estos resultados se ha demostrado que en condiciones de obesidad los factores de transcripción C/EBP, SREBP1c, PPAR γ que desencadenan la transcripción de la adiponectina disminuyen su expresión, generando así una disminución en los niveles de adiponectina (Sewter *et al.*, 2002; Bennett *et al.*, 2010; Motawi *et al.*, 2017). Por lo tanto, la estabilidad de la adiponectina en circulación se ve alterada por un ambiente obesogénico que afecta los factores pretranscripcionales y postraduccionales de la síntesis, oligomerización y secreción de adiponectina (Furukawa *et al.*, 2004; Eun *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007; Netzer *et al.*, 2015).

En contraste con la disminución en los niveles de adiponectina sérica, los niveles de proteína de Adipor2 en la zona de unión y la decidua de la placenta, así como en el miometrio incrementan en las ratas gestantes obesas en comparación con el grupo normopeso. A pesar de observarse cambios en la expresión a nivel de proteína, el ARNm de adipor2 fue similar en las placentas del grupo obeso y el grupo control. Estos resultados podrían sugerir que las diferencias observadas entre los grupos experimentales se deben a una regulación a nivel postranscripcional diferencial de la expresión de adipor2. En línea con estos hallazgos las discrepancias entre los niveles de ARNm y los niveles de proteína han sido reportados previamente en estudios realizados en humanos (Nogues *et al.*, 2019). Además, se ha reportado que el receptor Adipor2 es regulado a nivel postranscripcional mediante el

microARN 128, este mecanismo permite regular la sensibilidad a la adiponectina disminuyendo la disponibilidad del receptor (Du *et al.*, 2015).

En cuanto a los resultados de la inmunomarcación, en la zona de unión se detectó un incremento de Adipor2 en las células del espongiotrofoblasto con depósitos de glucógeno (Adamson *et al.*, 2002). Recientemente se ha establecido que la adiponectina induce la síntesis de glucógeno en células del estroma del endometrio, mientras que simultáneamente inhibe la glucólisis e incrementa la presencia de los transportadores de la glucosa, sugiriendo que la adiponectina actúa como un regulador en el metabolismo del glucógeno en estas células (Duval *et al.*, 2018). En la placenta de biomodelos murinos, se ha reportado que las células con depósitos de glucógeno constituyen una reserva de glucosa que es utilizada para sostener el crecimiento fetal durante la gestación tardía (Tunster *et al.*, 2020). Por tanto, es posible que el incremento de la expresión de Adipor2 en las células con depósitos de glucógeno durante la gestación temprana, pueda compensar la disminución en los niveles de adiponectina. Este mecanismo permitiría que en la placenta de biomodelos obesos las células con depósitos de glucógeno almacenen la reserva requerida para el desarrollo fetal durante la gestación tardía.

En la decidua de la placenta se encontró inmunomarcación del receptor de Adipor2 en células granulares cuya morfología, ubicación y reactividad de sus gránulos a la tinción con PAS es consistente con la descripción de las células uNK reportada previamente en la literatura (Zhang, Yamada and Croy, 2009; Beigi Boroujeni *et al.*, 2015). En células *natural killer* (NK) convencionales se ha reportado que la adiponectina suprime la producción de IFN- γ , e inhibe su citotoxicidad, ejerciendo un efecto anti-inflamatorio, posiblemente a través de la señalización vía receptores Adipor1 y Adipor2 (K. Kim *et al.* 2006). En murinos las células uNK son los linfocitos más abundantes en la placenta (Bulmer, Williams and Lash, 2010; Erlebacher, 2013). A diferencia de las NK convencionales, estas células no tienen actividad

citotóxica, sino que participan en la remodelación de las arterias espirales disminuyendo su resistencia y aumentando su capacidad de transporte (Cross *et al.*, 2002). En pacientes obesas se ha observado que las células uNK adquieren un perfil efector citotóxico que podría asociarse con complicaciones en la gestación tales como la preeclampsia (Castellana *et al.*, 2018). Aunque hasta el momento no existe un estudio que vincule de manera definitiva la señal de la adiponectina con el perfil funcional de las células uNK, podría ser posible que la adiponectina ejerza efectos anti-inflamatorios sobre estas células, inhibiendo su actividad citotóxica en la placenta. Por tanto, un incremento del receptor de Adipor2 podría mitigar los efectos de la deficiencia de adiponectina en los biomodelos obesos, contribuyendo a mantener el correcto funcionamiento de las células uNK. Sin embargo, las células uNK presentan alta heterogeneidad en la placenta (Sojka, Yang and Yokoyama, 2019), por lo que se requieren estudios que permitan confirmar su identidad y evaluar los efectos de la adiponectina sobre su función a fin de evaluar esta hipótesis

En biomodelos obesos se encontró un incremento en los niveles de la proteína Adipor2 en el músculo liso del miometrio, en comparación con sus contrapartes normopeso. Recientemente, se ha reportado que la adiponectina inhibe la contracción miometrial a través de la señalización mediada por el receptor adipor2, tanto en explantes del miometrio murino como en explantes del miometrio humano (Vyas *et al.*, 2019). Además, se ha encontrado que una reducción en los niveles de adiponectina sérica se asocia con un incremento en el riesgo de parto pretérmino (Kim *et al.*, 2017). Por tanto, se ha sugerido que la señal de adiponectina a través del receptor Adipor2 mantiene el útero en quiescencia durante la gestación (Vyas *et al.*, 2019). Teniendo en cuenta esta evidencia es posible que el incremento en los niveles de Adipor2 en el miometrio en biomodelos obesos esté impidiendo que la disminución de adiponectina conduzca a un incremento en la contractilidad miometrial, que podría poner en riesgo la gestación en este estadio.

En cuanto a la proyección de los resultados de este estudio en la gestación en humanos, los hallazgos reportados podrían sugerir que durante la gestación temprana en humanos podría también ocurrir un incremento en la expresión de Adipor2, que potencialmente podría mitigar los efectos deletéreos de la disminución abrupta en los niveles adiponectina. Sin embargo, en contraste con los resultados presentados en este estudio, en placentas humanas a término, se encontró una disminución en la expresión a nivel de proteína del receptor Adipor2 en las placentas de las gestantes obesas en comparación con sus contrapartes normopeso (Nogues *et al.*, 2019). Esta discrepancia podría explicarse por las diferencias que se presentan entre la gestación temprana y la gestación tardía. En condiciones fisiológicas los niveles de adiponectina van decayendo progresivamente entre el primer y el tercer trimestre del embarazo en humanos (Catalano *et al.* 2006; Jones, Jansson, and Powell 2010; Mazaki-Tovi *et al.* 2007; Rosario *et al.* 2012a). Además, en biomodelos murinos se ha mostrado que los niveles de ARNm del receptor Adipor2 también se regulan a lo largo de la gestación (Caminos *et al.*, 2005). Por tanto, es posible que los efectos de la obesidad sobre la expresión de Adipor2 sean distintos entre la gestación temprana y tardía. En este sentido, sería necesario establecer si en biomodelos gestantes obesos los niveles de Adipor2 a nivel de proteína se comportan de manera similar durante la gestación tardía. De encontrarse resultados similares, podría sugerirse que los resultados obtenidos en biomodelos pueden extrapolarse a la gestación humana.

En conjunto los resultados sobre el incremento en los niveles de proteína del receptor Adipor2 y la reducción en los niveles de adiponectina sérica, podrían sugerir que en biomodelos gestantes obesos el incremento en los niveles del receptor podría actuar como un mecanismo de compensación que mitigaría los efectos deletéreos de la disminución drástica de la adiponectina en la gestación temprana. Entre estos efectos se incluyen alteraciones en el metabolismo del glucógeno, potenciales alteraciones en el perfil funcional de las células uNK

y modificaciones en la contractilidad miometrial. Teniendo en cuenta esta evidencia, se propone realizar ensayos que permitan establecer si en efecto el incremento en la expresión de Adipor2 en la placenta y el miometrio tiene repercusiones funcionales en la gestación temprana. En cuanto a la proyección de estos resultados en humanos, se requiere una mayor evidencia para soportar una posible similitud entre el comportamiento de Adipor2 en la gestación temprana en condiciones de obesidad entre biomodelos y humanos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el proyecto 57610 “Hormonas Tiroideas en la gestante obesa y potencial uso como biomarcadores de la salud materno-fetal” otorgado por Colciencias. Agradezco a los laboratorios de microbiología, histología y LABBIO de la Universidad del Valle. A Yhoiss Muñoz MSc y David Moreno BSc por su contribución y asesoría en la detección de adipor2. A Sirsa Hidalgo MsC por su tutoría en el manejo de los biomodelos. Al grupo de investigación Teblami por el apoyo a mi formación académica y personal.

LITERATURA CITADA

- Adamson, S. L. *et al.* (2002) ‘Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta’, *Developmental Biology*. doi: 10.1016/S0012-1606(02)90773-6.
- Beigi Boroujeni, Mandana *et al.* (2015) ‘Low-Dose Aspirin and Uterine Natural Killer Cells in Mice at Day Seven of Pregnancy’, *Jentashapir Journal of Health Research*. doi: 10.17795/jjhr-27858.
- Bennett, C. E. *et al.* (2010) ‘CCAAT/enhancer binding protein α , β and δ gene variants: Associations with obesity related phenotypes in the Leeds Family Study’, *Diabetes and Vascular Disease Research*. doi: 10.1177/1479164110366274.
- Berti, C. *et al.* (2016) ‘Pregnancy and Infants’ Outcome: Nutritional and Metabolic Implications’, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(1), pp. 82–91. doi: 10.1080/10408398.2012.745477.
- Bulmer, J. N., Williams, P. J. and Lash, G. E. (2010) ‘Immune cells in the placental bed’,

International Journal of Developmental Biology. doi: 10.1387/ijdb.082763jb.

Buyukdere, Y., Gulec, A. and Akyol, A. (2019) 'Cafeteria diet increased adiposity in comparison to high fat diet in young male rats', *PeerJ*. doi: 10.7717/peerj.6656.

Camino, J. E. *et al.* (2005) 'Expression and regulation of adiponectin and receptor in human and rat placenta', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90, pp. 4276–4286. doi: 10.1210/jc.2004-0930.

Castellana, B. *et al.* (2018) 'Maternal obesity alters uterine NK activity through a functional KIR2DL1/S1 imbalance', *Immunology and Cell Biology*. doi: 10.1111/imcb.12041.

Cross, J. C. *et al.* (2002) 'Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta', in *Molecular and Cellular Endocrinology*. doi: 10.1016/S0303-7207(01)00703-1.

Du, H. *et al.* (2015) 'MicroRNA-218 targets adiponectin receptor 2 to regulate adiponectin signaling', *Molecular Medicine Reports*. doi: 10.3892/mmr.2015.3282.

Erlebacher, A. (2013) 'Immunology of the maternal-fetal interface', *Annual Review of Immunology*. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-100003.

Eun, H. K. *et al.* (2007) 'Essential role of mitochondrial function in adiponectin synthesis in adipocytes', *Diabetes*. doi: 10.2337/db07-0510.

Fu, Y. *et al.* (2005) 'Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation', *Journal of Lipid Research*. doi: 10.1194/jlr.M400373-JLR200.

Furukawa, S. *et al.* (2004) 'Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome', *Journal of Clinical Investigation*. doi: 10.1172/JCI21625.

Gaillard, R. *et al.* (2013) 'Risk factors and outcomes of maternal obesity and excessive weight gain during pregnancy', *Obesity*, 21, pp. 1046–1055. doi: 10.1002/oby.20088.

Gaudet, L. *et al.* (2014) 'Maternal obesity and occurrence of fetal macrosomia: A systematic review and meta-analysis', *BioMed Research International*, 2014, p. 640291. doi: 10.1155/2014/640291.

Gomez-Smith, M. *et al.* (2016) 'A physiological characterization of the Cafeteria diet model of metabolic syndrome in the rat', *Physiology and Behavior*. doi: 10.1016/j.physbeh.2016.09.029.

Haghiac, M. *et al.* (2014) 'Patterns of adiponectin expression in term pregnancy: Impact of obesity', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 99(9), pp. 3427–3434. doi: 10.1210/jc.2013-4074.

Hillemeier, M. M. *et al.* (2011) 'Transition to overweight or obesity among women of reproductive age.', *Journal of women's health (2002)*, 20((5)), pp. 703–710. doi:

10.1089/jwh.2010.2397.

Jansson, N. *et al.* (2008) 'Maternal hormones linking maternal body mass index and dietary intake to birth weight', *American Journal of Clinical Nutrition*, 87((6)), pp. 1743–1749. doi: 10.1093/ajcn/87.6.1743.

Kendig, M. D., Westbrook, R. F. and Morris, M. J. (2019) 'Pattern of access to cafeteria-style diet determines fat mass and degree of spatial memory impairments in rats', *Scientific Reports*. doi: 10.1038/s41598-019-50113-3.

Kim, S. S. *et al.* (2017) 'Spontaneous and indicated preterm delivery risk is increased among overweight and obese women without prepregnancy chronic disease', *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 124(11), pp. 1708–1716. doi: 10.1111/1471-0528.14613.

Kopelman, D. *et al.* (2009) *Clinical Obesity in Adults and Children*, Wiley-Blackwell Publishing. doi: 10.1111/j.1464-5491.2006.01902.x.

Lekva, T. *et al.* (2017) 'Large reduction in adiponectin during pregnancy is associated with large-for-gestational-age newborns', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 102((7)), pp. 2552–2559. doi: 10.1210/jc.2017-00289.

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) 'Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method', *Methods*, 25(4), pp. 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.

MacEdo, I. C. *et al.* (2012) 'Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels', *Peptides*. doi: 10.1016/j.peptides.2012.08.007.

Mayorga, M. E. *et al.* (2015) 'Trends in BMI and obesity in U.S. women of childbearing age during the period of 1980-2010', *HS*, 4(3), pp. 176–186. doi: 10.1057/hs.2014.29.

Mazaki-Tovi, S. *et al.* (2007) 'Maternal serum adiponectin levels during human pregnancy.', *Journal of perinatology: official journal of the California Perinatal Association*, 27((2)), pp. 77–81. doi: 10.1038/sj.jp.7211639.

Mission, J. F., Marshall, N. E. and Caughey, A. B. (2015) 'Pregnancy Risks Associated with Obesity', *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 68((5)), pp. 389–399. doi: 10.1016/j.ogc.2015.01.008.

Motawi, T. K. *et al.* (2017) 'Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma in Obesity and Colorectal Cancer: The Role of Epigenetics', *Scientific Reports*. doi: 10.1038/s41598-017-11180-6.

Netzer, N. *et al.* (2015) 'Hypoxia, oxidative stress and fat', *Biomolecules*. doi: 10.3390/biom5021143.

- Nogues, P. *et al.* (2019) 'Maternal obesity influences expression and DNA methylation of the adiponectin and leptin systems in human third-trimester placenta', *Clinical Epigenetics*, 11(1). doi: 10.1186/s13148-019-0612-6.
- Poston, L. *et al.* (2016) 'Preconceptional and maternal obesity: epidemiology and health consequences', *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 4, pp. 1025–1036. doi: 10.1016/S2213-8587(16)30217-0.
- Powell, T. L. *et al.* (2015) 'Adiponectin - cross talk between maternal adipose tissue and placenta', *Placenta*, 36(4), p. 474. doi: 10.1016/j.placenta.2015.01.397.
- Qiao, L. *et al.* (2016) 'Knockout maternal adiponectin increases fetal growth in mice: potential role for trophoblast IGFBP-1', *Diabetologia*, 59, pp. 2417–2425. doi: 10.1007/s00125-016-4061-x.
- Rosario, F. J. *et al.* (2015) 'Increased placental nutrient transport in a novel mouse model of maternal obesity with fetal overgrowth', *Obesity*, 23((8)), pp. 1663–1670. doi: 10.1002/oby.21165.
- Ruan, H. and Dong, L. Q. (2016) 'Adiponectin signaling and function in insulin target tissues', *J Mol Cell Biol*, 8((2)), pp. 101–9. doi: 10.1093/jmcb/mjw014.
- Sampey, B. P. *et al.* (2011) 'Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet.', *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 19((6)), pp. 1109–1117. doi: 10.1038/oby.2011.18.
- Sewter, C. *et al.* (2002) 'Human obesity and type 2 diabetes are associated with alterations in SREBP1 isoform expression that are reproduced ex vivo by tumor necrosis factor- α ', *Diabetes*. doi: 10.2337/diabetes.51.4.1035.
- Sojka, D. K., Yang, L. and Yokoyama, W. M. (2019) 'Uterine natural killer cells', *Frontiers in Immunology*. doi: 10.3389/fimmu.2019.00960.
- Stang, J. and Huffman, L. G. (2016) 'Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Obesity, Reproduction, and Pregnancy Outcomes', *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 116((4)), pp. 677–691. doi: 10.1016/j.jand.2016.01.008.
- Tejada López, M. E., Ortiz, M. A. and Pustovrh, M. C. (2016) *Efectos de la obesidad materna sobre el patrón de apoptosis en la cardiogénesis tardía de la rata Wistar*. Universidad del Valle.
- Tunster, S. J. *et al.* (2020) 'Placental glycogen stores and fetal growth: Insights from genetic mouse models', *Reproduction*. doi: 10.1530/REP-20-0007.
- Vasudevan, C., Renfrew, M. and McGuire, W. (2011) 'Fetal and perinatal consequences of maternal obesity', *Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition*, 96, pp.

378–382. doi: 10.1136/adc.2009.170928.

Vyas, V. *et al.* (2019) ‘Adiponectin links maternal metabolism to uterine contractility’, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 33(12), pp. 14588–14601. doi: 10.1096/fj.201901646R.

Wang, Z. V. *et al.* (2007) ‘Secretion of the Adipocyte-Specific Secretory Protein Adiponectin Critically Depends on Thiol-Mediated Protein Retention’, *Molecular and Cellular Biology*. doi: 10.1128/mcb.00931-06.

Weiwei, T. *et al.* (2009) ‘Expressions of adiponectin receptors in placenta and their correlation with preeclampsia’, *Reproductive Sciences*, 16((7)), pp. 676–684. doi: 10.1177/1933719109334258.

WHO (2018) *Obesity and overweight*, *World Health Organization*. Available at: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (Accessed: 14 September 2018).

Yamauchi, T. *et al.* (2003) ‘Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects’, *Nature*, 423, pp. 762–769. doi: 10.1038/nature01705.

Yamauchi, T. and Kadowaki, T. (2013) ‘Adiponectin receptor as a key player in healthy longevity and obesity-related diseases’, *Cell Metabolism*, 17, pp. 185–196. doi: 10.1016/j.cmet.2013.01.001.

Zeeni, N. *et al.* (2013) ‘A cafeteria diet modifies the response to chronic variable stress in rats’, *Stress*. doi: 10.3109/10253890.2012.708952.

Zera, C., McGirr, S. and Oken, E. (2011) ‘Screening for obesity in reproductive-aged women.’, *Preventing chronic disease*, 8((6)), p. 125. doi: A125 [pii].

Zhang, J. H., Yamada, A. T. and Croy, B. A. (2009) ‘DBA-lectin Reactivity Defines Natural Killer Cells that have Homed to Mouse Decidua’, *Placenta*. doi: 10.1016/j.placenta.2009.08.011.

TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Caracterización de los biomodelos del grupo control y el grupo obeso (a) Ganancia de peso (%) a las 7 semanas de alimentación. **(b)** Niveles de glucosa en sangre (mg/dL) a 12.5 días de gestación **(c)** Niveles de triglicéridos (mg/dL) 12.5 días de gestación en plasma y **(d)** Niveles de colesterol en plasma del grupo control y el grupo obeso a 12.5 días de gestación. Control n=10, Obeso n=10. *** $p < 0.001$.

Figura 2. Niveles en plasma de adiponectina y expresión de ARNm de Adipor2 en biomodelo obeso inducido por dieta de cafetería: (a) Adiponectina en plasma (pg/mL) de biomodelos control y obesos n=8, Obeso n=8 **(b)** Expresión relativa de ARNm de Adipor2 en placentas de ratas Wistar hembras al día 12,5 de gestación control, n=10, obeso n=10. * $p < 0.05$.

Figura 3. Histología placentaria de rata al día 12,5 de gestación: (a) Reconstrucción placentaria, corte longitudinal sobre el eje mayor de la placenta de 12,5 dg. H-E, reconstrucción a 10X, D: decidua, M: miometrio, ZL: zona del laberinto y ZU: zona de unión; Tamaño de la barra= 1000 μ m. **(b)** Zona del laberinto CE: Célula endotelial, CI: Citotrofoblasto, EF: Eritrocito fetal, EM: Eritrocito materno, LM: Laguna materna, SI: Sincitiotrofoblasto, VF: Vaso fetal. **(c)** Zona de unión CG: Células glucogénicas, ES: Espongiotrofoblasto; **(d)** CTG: Célula trofoblástica gigante. **(e)** Decidua CD: Célula decidual, CDG: Célula decidual con reserva de glucógeno. Miometrio **(f)** AS: Arteria espiral, MI: miocito liso, TC: Tejido conectivo, **(g)** GR: células granulares, aparentemente *Natural killer* uterina. Tamaño de la barra= 10 μ m.

Figura 4. Nivel y patrón de expresión de Adipor2 en placenta y miometrio de rata de 12,5 dg en biomodelo obeso inducido por dieta de cafetería: (a) Niveles de expresión en valores de IOD en la placenta, **(b)** Niveles de expresión en valores de IOD en las zonas de la placenta del grupo control y obeso: decidua, zona de unión y zona del laberinto. **(c)** Niveles de expresión en valores de IOD en el miometrio, **(d)** Patrón de expresión la de Adipor2 en placenta y miometrio. Datos de la media reportados con el error estándar. Control=10, Obeso n=10. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Tamaño de la barra= 10 μ m.

Tabla 1. Cebadores para qRT-PCR

Gen	Directo (5'-3')	Reverso (5'-3')
Adipor2	ATGTTTGCCACCCCTCAGT	GATTCCACTCAGACCCAAGC
18S ARNr	GGTTCGATTCCGGAGAGG	TCGGGAGTGGGTAATTGC

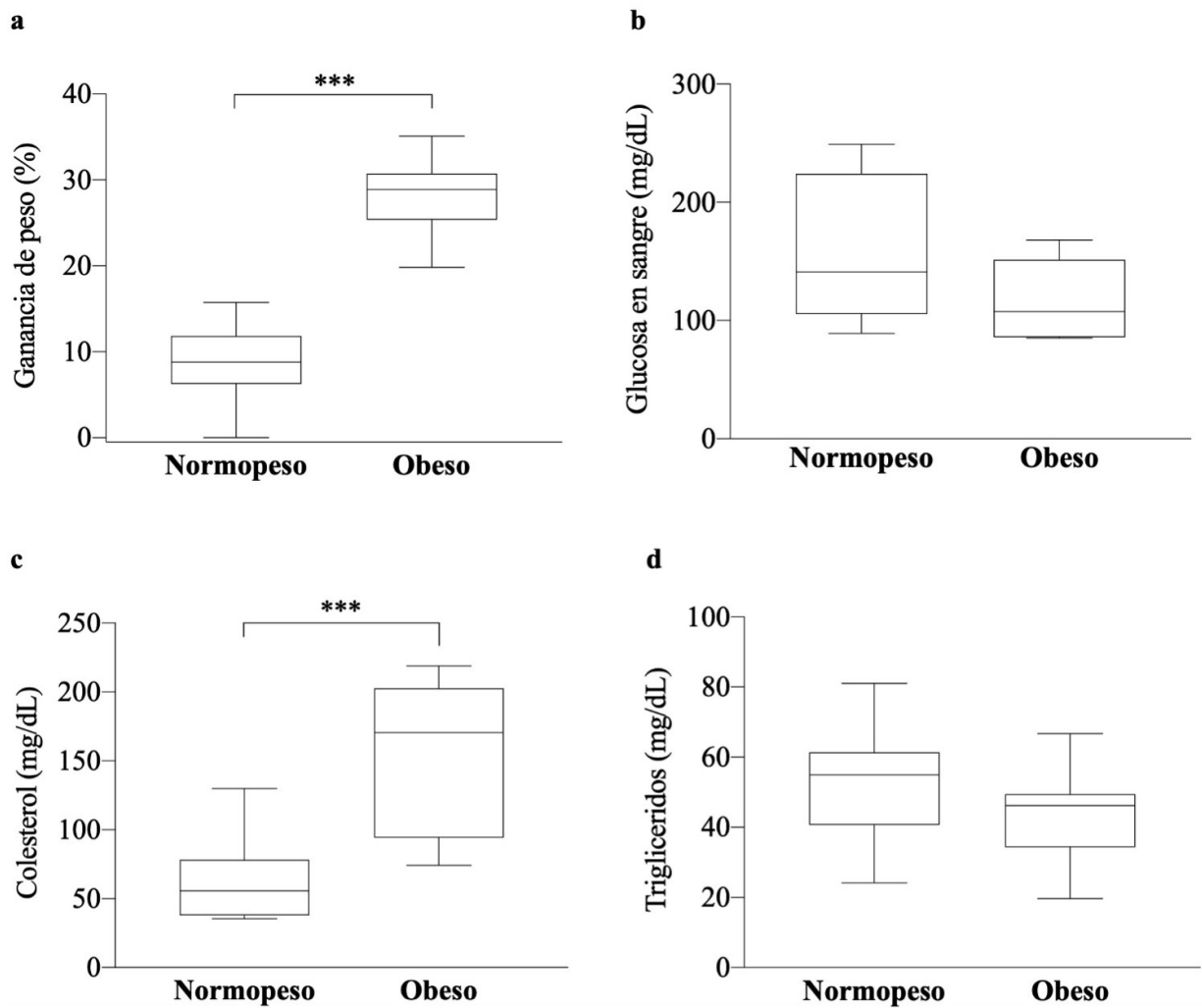


Figura 1. Caracterización de los biomodelos del grupo control y el grupo obeso (a) Ganancia de peso (%) a las 7 semanas de alimentación. **(b)** Niveles de glucosa en sangre (mg/dL) a 12.5 días de gestación **(c)** Niveles de triglicéridos (mg/dL) 12.5 días de gestación en plasma y **(d)** Niveles de colesterol en plasma del grupo control y el grupo obeso a 12.5 días de gestación. Control n=10, Obeso n=10. *** $p < 0.001$.

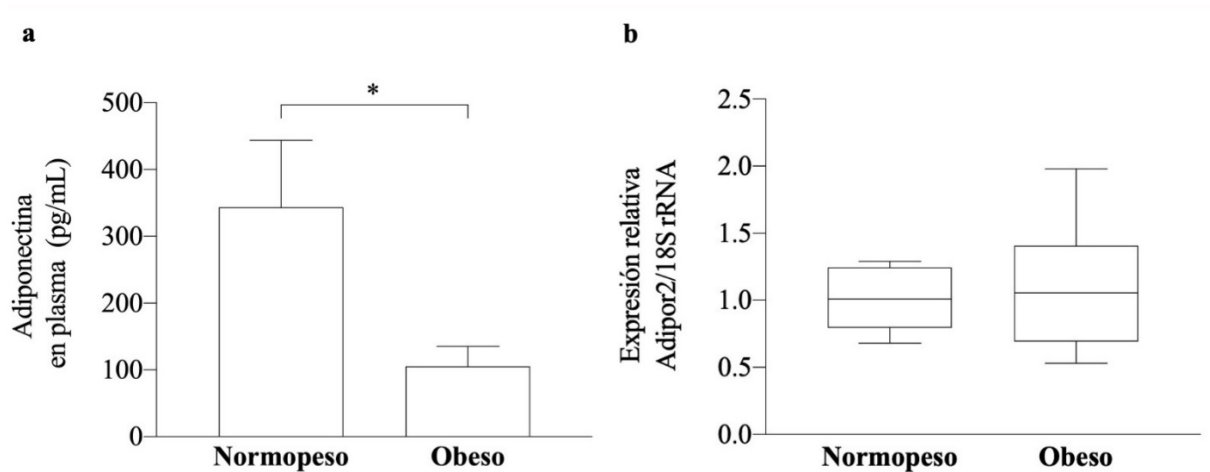


Figura 2. Niveles en plasma de adiponectina y expresión de ARNm de Adipor2 en biomodelos obesos inducido por dieta de cafetería: (a) Adiponectina en plasma (pg/mL) de biomodelos control y obesos n=8, Obeso n=8 (b) Expresión relativa de ARNm de Adipor2 en placentas de ratas Wistar hembras al día 12,5 de gestación control, n=10, obeso n=10. * $p < 0.05$.

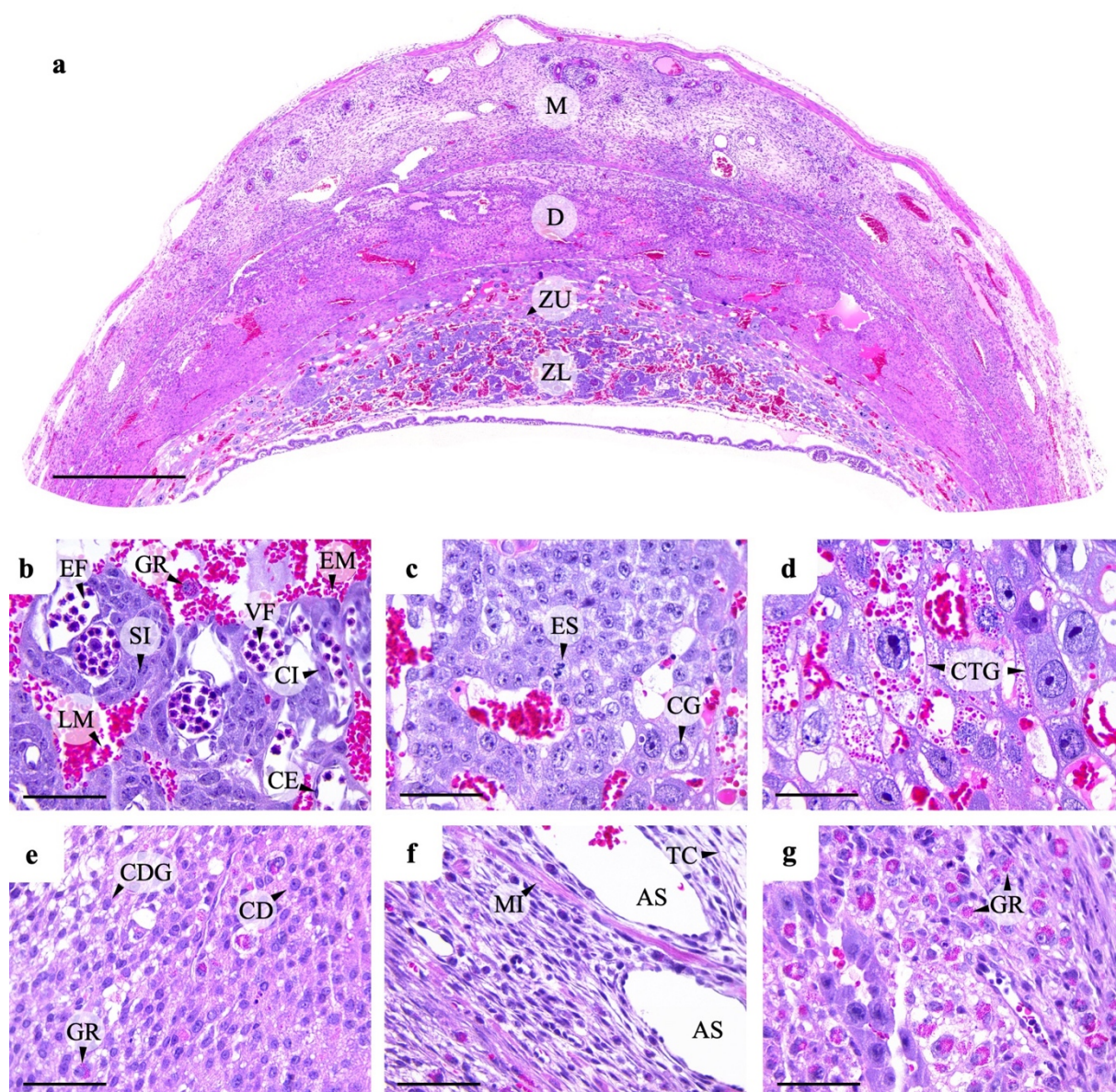


Figura 3. Histología placentaria de rata al día 12,5 de gestación: (a) Reconstrucción placentaria, corte longitudinal sobre el eje mayor de la placenta de 12,5 dg. H-E, reconstrucción a 10X, D: decidua, M: miometrio, ZL: zona del laberinto y ZU: zona de unión; Tamaño de la barra= 1000 μ m. (b) Zona del laberinto CE: Célula endotelial, CI: Citotrofoblasto, EF: Eritrocito fetal, EM: Eritrocito materno, LM: Laguna materna, SI: Sincitiotrofoblasto, VF: Vaso fetal. (c) Zona de unión CG: Células glucogénicas, ES: Espongiotrofoblasto; (d) CTG: Célula trofoblástica gigante. (e) Decidua CD: Célula decidua, CDG: Célula decidua con reserva de glucógeno. Miometrio (f) AS: Arteria espiral, MI: miocito liso, TC: Tejido conectivo, (g) GR: células granulares, aparentemente *Natural killer* uterina. Tamaño de la barra= 10 μ m

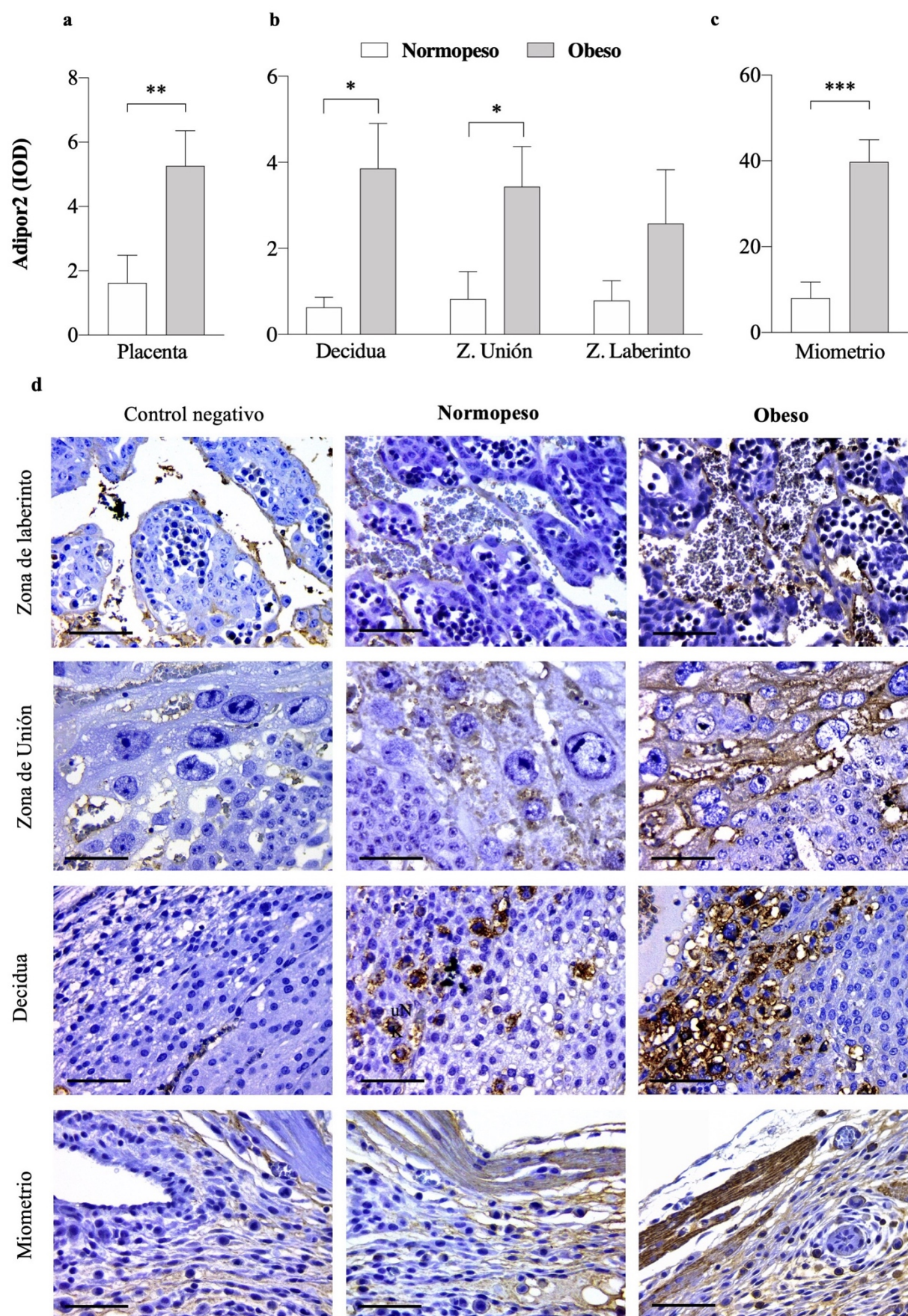


Figura 4. Nivel y patrón de expresión de Adipor2 en placenta y miometrio de rata de 12,5 dg en biomodelo obeso inducido por dieta de cafetería: (a) Niveles de expresión reportados como densidad óptica integrada en la placenta, (b) Niveles de expresión en valores de densidad óptica integrada en las zonas de la placenta del grupo control y obeso: decidua, zona de unión y zona del laberinto. (c) Niveles de expresión en valores de densidad óptica integrada en el miometrio, (d) Patrón de expresión la de Adipor2 en placenta y miometrio. Datos de la media reportados con el error estándar. Control=10, Obeso n=10. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Tamaño de la barra= $10\mu\text{m}$

APÉNDICES

Apéndice 1. Contenido nutricional de la dieta de cafetería.

Producto	Calorías	Grasas totales	Carbohidratos totales	Proteínas
Papas fritas	173,4	12,3	10,5	5,4
Chonticos	163,5	10,8	13,5	2,7
Tocinetas	157,5	8,4	18	2,4
Yupis	150	7,5	18	0
Saltín Noel Tradicional	124,2	2,7	23,7	2,1
Galletas Festival	132	4,8	21,6	1,2
Snacky	144	5,4	24	0
Rosquillas Caleñas	120	3,9	20,1	2,1
Frootloops	120	1	25	2
Pan	89,1	1,8	15,3	1,8
Saltín Noel Trigo y Maíz	125,1	5,1	18,9	2,4
Brownie	128,7	6	16,8	1,8
Cheesetris	150	7,5	21	0
Chocorramo	128,7	6,9	14,7	2,7
Chocolatina	166,8	10,8	16,8	1,8
Queso crema	90	9	0	2,1
Salchicha	58,5	4,5	2,1	3,6
Lab Diet 5010	92,4	1,5	17,7	6,9