

## Modelos experimentales para estudiar el tejido adiposo en obesidad infantil

Begoña Nieto<sup>1</sup>, Laura Herrero<sup>1,2</sup>, Marijana Todorčević<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica y Fisiología, Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación, Instituto de Biomedicina de la Universidad de Barcelona (IBUB), Universitat de Barcelona (UB), E-08028 Barcelona, España.

<sup>2</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, E-28029 Madrid, España

E-mail: lherrero@ub.edu, mtodorcevic@ub.edu

DOI: <https://www.doi.org/10.53435/funj.00925>

Recepción: 28-Febrero-2023

Aceptación: Julio-2023

Publicación online: N° Octubre 2023

### Resumen

La obesidad es un grave problema de salud que tiene repercusiones significativas en el bienestar de las personas y los sistemas de salud públicos. Se asocia con una reducción en la esperanza de vida y es un factor de riesgo para diversas enfermedades metabólicas como la diabetes de tipo 2, enfermedades coronarias y ciertos tipos de cáncer. Si bien la atención se ha centrado principalmente en la obesidad en la edad adulta, la obesidad infantil sigue siendo poco conocida. La obesidad infantil está aumentando de manera alarmante y se correlaciona con enfermedades metabólicas de gravedad. Por lo tanto, se necesitan modelos celulares y animales que ayuden a dilucidar las causas moleculares y genéticas

subyacentes a la obesidad infantil. En el presente artículo revisamos el tema de la obesidad infantil, centrándose en los diferentes tipos de tejido adiposo, diferencias entre el tejido adiposo en adultos y niños, modelos experimentales disponibles actualmente para estudiar el tejido adiposo en niños y los factores involucrados en la patogénesis de la obesidad infantil.

### Palabras clave:

- Obesidad
- Tejido adiposo
- Niños
- Modelos experimentales

## Experimental models to study adipose tissue in childhood obesity

### Abstract

Obesity is a major public health concern that has significant repercussions on individuals' well-being and healthcare systems. It is associated with a reduced lifespan and is a risk factor for several chronic diseases, such as type 2 diabetes, coronary heart diseases, and certain types of cancers. While adulthood obesity has largely been in the spotlight, childhood obesity remains poorly understood. Childhood obesity is becoming more prevalent and is correlated with illness; therefore, there is an urgent requirement for cell and animal models to help elucidate the underlying molecular and genetic causes. Here, we review the emerging field of

childhood obesity, focusing on the different types of adipose tissue, differences between adipose tissue in adults and children, current available experimental models to study adipose tissue in children, and factors involved in the pathogenesis of childhood obesity.

### Keywords:

- Obesity
- Adipose tissue
- Children
- Experimental models

## Obesidad infantil

La obesidad es una amenaza global. Si bien hasta hace poco era predominante en adultos, la obesidad es cada vez más frecuente en las generaciones más jóvenes, incluidos los niños menores de 10 años. En 2019, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que había 38,2 millones de niños menores de 5 años que sufrían sobrepeso u obesidad. Los datos de 2016 revelaron que más de 340 millones de niños y adolescentes (18 %) de 5 a 19 años padecían obesidad o sobrepeso. Además, la OMS también informó de que, si bien el sobrepeso y la obesidad anteriormente solo se consideraban una preocupación en los países de renta per cápita elevada, están creciendo exponencialmente en los países de rentas bajas y medias, con un marcado énfasis en las áreas urbanas (2019)<sup>1</sup>. Por lo tanto, deben hacerse esfuerzos a nivel de investigación clínica y social para detener el alarmante crecimiento de la obesidad y sus enfermedades metabólicas asociadas tanto en adultos como en niños.

## Tejido adiposo: Colores y funciones

El tejido adiposo (TA) es un órgano endocrino complejo y altamente dinámico con actividad metabólica intrincada que influye en gran medida en la función de casi todos los demás sistemas orgánicos a través de sus diversos adipoquinas, lipoquinas, lípidos y péptidos<sup>2</sup>. La distribución, localización y color del TA determinan su función. El existente debajo de la piel se conoce como tejido adiposo subcutáneo (TAS), mientras que el que se encuentra en los órganos internos circundantes se conoce como tejido adiposo visceral (TAV)<sup>3</sup>. En los mamíferos, el TA se manifiesta en cuatro colores diferentes: Blanco, marrón, beige y rosa. En resumen, la función principal del tejido adiposo blanco (TAB) es almacenar energía no utilizada en forma de triglicéridos y liberarla como ácidos grasos en tiempos de necesidad sistémica de energía, mientras que el tejido adiposo marrón (TAM) utiliza combustibles, como la glucosa o los lípidos para mantener la temperatura corporal central y funciona como un tejido termogénico<sup>4</sup>. Los adipocitos beige surgen dentro del TAB debido a la diferenciación de precursores de adipocitos blancos o a la transdiferenciación de adipocitos blancos ya maduros. Los adipocitos beige y marrones comparten muchos rasgos funcionales y morfológicos. Toman glucosa y triglicéridos para generar calor en respuesta a la exposición al frío y al ejercicio<sup>5</sup>. Finalmente, los adipocitos rosados son

células epiteliales alveolares dentro de la glándula mamaria que son responsables de producir y secretar leche<sup>6</sup>. Se han utilizado varios modelos para estudiar el tejido adiposo en adultos y niños: 1) líneas de cultivo celular *in vitro* y adipocitos primarios derivados tanto de animales como de humanos y 2) modelos animales *in vivo* (resumidos en la Tabla 1 y sección “Modelos a estudiar” a continuación).

## Diferencias en el TA de niños y adultos

Las características del TA y su respuesta a los insumos patológicos, como la obesidad, difieren de los niños a los adultos<sup>7,8</sup>. En general, el crecimiento del TA se puede clasificar como hipertrófico, cuando aumenta el tamaño de los adipocitos, o hiperplásico, cuando aumenta el número de adipocitos<sup>9</sup>. La masa de grasa corporal se expande significativamente debido a la ampliación del tamaño celular (hipertrofia) hasta los 6 meses de edad. Sin embargo, desde los 6 meses de edad hasta la adolescencia temprana (alrededor de los 10 años), el contenido de grasa aumenta junto con el número de células<sup>10,11</sup>. La pubertad (de 10 a 18 años) se caracteriza por un aumento tanto de la hipertrofia como de la hiperplasia. Esta etapa también está marcada por el dimorfismo sexual. De hecho, el dimorfismo sexual normalmente emerge durante las etapas embrionarias. Sin embargo, en el caso de la obesidad, es durante la pubertad que estas diferencias se vuelven significativamente pronunciadas y continúan hasta la edad adulta. Por lo tanto, la utilización de modelos experimentales celulares y animales se vuelve crucial en la investigación de este importante aspecto. La distribución de grasa subcutánea difiere entre hombres y mujeres. Alrededor de los 18 años, bajo condiciones normales de peso, el número de células alcanza una meseta, estableciendo el número de adipocitos para el futuro<sup>10,11</sup>. En la edad adulta, la capacidad de diferenciación de preadipocitos disminuye, y por lo tanto, el contenido de grasa aumenta principalmente debido a la hipertrofia de adipocitos, en contraste con la infancia y la adolescencia<sup>12,13</sup>. Además, se ha demostrado que el envejecimiento fomenta la redistribución reduciendo significativamente el TAS y aumentando simultáneamente el TAV<sup>13</sup>. Este reordenamiento es una de las causas sugeridas con más firmeza para explicar por qué las personas mayores muestran una peor salud metabólica que las generaciones más jóvenes<sup>13</sup>.

## Modelos para estudiar el TA

Los estudios sobre la obesidad infantil, junto con su prevalencia global, son un fenómeno relativamente reciente y, en consecuencia, los datos de modelos celulares y animales son escasos. Para planificar estrategias para tratar y prevenir la obesidad y las complicaciones metabólicas relacionadas es necesaria una comprensión más profunda de los mecanismos moleculares que regulan la función y disfunción de los adipocitos en los niños. En las últimas décadas, se han utilizado varios modelos de células de preadipocitos y adipocitos maduros para estudiar la adipogénesis en adultos. Las líneas celulares de roedores son los modelos más utilizados, aunque tanto las células primarias porcinas como las felinas también se han utilizado en menor medida<sup>14,15</sup>. Entre los roedores, los preadipocitos de ratón, como 3T3-L1, 3T3-F442A, OP9 y C3H10T1/2, se han estudiado en detalle a lo largo de los años, siendo 3T3-L1 la línea celular más establecida y comúnmente utilizada<sup>15</sup>. Sin embargo, los preadipocitos primarios porcinos se han sugerido como un mejor modelo para la investigación de la obesidad debido a su mayor similitud con las células humanas<sup>15</sup> (Tabla 1).

Además, cada vez se han utilizado más las líneas celulares humanas (ChubS<sup>16</sup> e imAPAD<sup>17</sup> e imGPAD<sup>17</sup>) y las células primarias para estudiar la biología de los adipocitos y los cambios relacionados con la obesidad. Sin embargo, solo una línea celular de preadipocitos, el síndrome de Simpson-Golabi-Behmel (SGBS), se ha aislado de los niños<sup>18</sup>. Esta línea celular se derivó del TA de un lactante con SGBS, que es un síndrome bastante raro caracterizado por macroglosia, macrosomía, anomalías renales y esqueléticas, y un mayor riesgo de cáncer embrionario, distinto de la obesidad poligénica o monogénica. Si bien los conocimientos obtenidos del estudio de las células SGBS son sin duda valiosos, es importante considerar que los resultados pueden ser aplicables solo dentro de un contexto específico. Un estudio reciente ha demostrado que estas células son metabólicamente distintas de los adipocitos primarios<sup>19</sup>, lo que indica la importancia de establecer modelos celulares derivados de niños sanos y obesos para otros estudios (Tabla 1).

Los modelos *in vivo* también son cruciales para evaluar los ensayos básicos y clínicos. Los modelos animales pequeños, como *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, y *Danio rerio*, han mostrado muchas ventajas debido a su corto ciclo de vida, conocidos mapas del genoma y bajo costo de

mantenimiento, para estudiar los fundamentos mecanicistas de diversas condiciones patológicas. La investigación sobre la obesidad en *C. elegans* ha revelado factores involucrados tanto en la detección de alimentos como en la saciedad de los alimentos. Por el contrario, los estudios que utilizaron *D. melanogaster* identificaron vías neuronales involucradas en la deposición de grasa<sup>20</sup>. Si bien los modelos animales pequeños pueden ser valiosos para varios estudios preclínicos, pueden no ser adecuados para evaluar los efectos del sistema multiorgánico de la obesidad en adultos o niños. Sin embargo, estos modelos animales pueden contribuir a la comprensión de las vías moleculares y neurológicas que pueden ser influenciadas o interrumpidas por la obesidad infantil. Por lo tanto, los roedores pequeños, como los ratones y las ratas, se emplean ampliamente como sistemas modelo *in vivo de* mamíferos para la obesidad y los trastornos derivados a nivel genético, molecular y funcional<sup>20</sup>. Se han utilizado crías de ratas Zucker para estudiar el crecimiento desde la lactancia hasta las etapas de la pubertad. El uso de este modelo reveló que las tasas más altas de proliferación de adipocitos, lipogénesis *de novo* y acumulación excesiva de grasa ocurrieron al final de la etapa de lactancia (Tabla 1)<sup>21</sup>. La premisa de que la fisiología y el metabolismo humano difieren de los de los animales y que el desarrollo del TA es diferente entre niños y adultos limita la percepción que estos estudios pueden proporcionar sobre la obesidad y sus enfermedades asociadas en niños<sup>14,15</sup>.

## Factores que intervienen en la patogénesis de la obesidad infantil

En términos de factores socioeconómicos y ambientales, se ha reportado que el índice de masa corporal (IMC) de un niño y el IMC de su madre y el nivel de educación están asociados con el riesgo de volverse obeso<sup>22</sup>. Estos tres factores de riesgo son particularmente notables a partir de los 6 años. El sobrepeso y la obesidad eran marcadamente prevalentes entre los niños que anteriormente mostraban una de las tres características, proporcionando evaluaciones fáciles y rápidas y evaluaciones de prevención adicionales en los encuentros clínicos<sup>22</sup>.

Además, algunos estudios han intentado descubrir patrones epigenéticos directamente relacionados con la obesidad infantil emergente. Estas modificaciones transcripcionales

Tabla 1: Modelos para estudiar el tejido adiposo. Resumen de los modelos adiposos in vitro e in vivo tratados en este artículo.

Modelos de línea celular animal <sup>14</sup>	
<b>Ratón 3T3-L1</b>	Derivado de fibroblastos embrionarios de un ratón suizo 3T3 de 17 a 19 días de edad, modelo de línea celular más utilizado para estudiar la adipogénesis, número alto de pases celulares
<b>Ratón 3T3-F442A</b>	Derivado de células suizas murinas 3T3. Capaz de acumular mayor contenido de grasa que la 3T3-L1
<b>Ratón OP9</b>	Derivado de la calota de ratones recién nacidos. Rápida diferenciación adipogénica (72 h). Adecuado para ensayos de alto rendimiento
<b>Ratón C3H10T1/2</b>	Derivado de precursores embrionarios de células madre de entre 14 y 17 días de edad. Se utiliza con frecuencia para estudiar la adipogénesis
Células animales primarias <sup>13,14</sup>	
<b>Células porcinas</b>	Mejor modelo para la adipogénesis y las complicaciones relacionadas con el tejido adiposo en comparación con los roedores debido a su mayor similitud con las células humanas
<b>Células felinas</b>	Se utiliza para estudiar la adipogénesis y la diabetes tipo 2
Modelos de líneas celulares humanas	
<b>ChubS7 <sup>15</sup></b>	Derivado del tejido adiposo subcutáneo abdominal de una mujer obesa de 33 años de edad, alta tasa de proliferación y diferenciación
<b>ImAPAD <sup>16</sup></b>	Derivado del tejido adiposo subcutáneo abdominal de un varón sano de 50 años de edad, alta tasa de proliferación y diferenciación. Función específica de almacén de mantenimiento
<b>ImGPAD <sup>16</sup></b>	Derivado del tejido adiposo subcutáneo del glúteo de un varón sano de 50 años de edad, alta tasa de proliferación y diferenciación. Función específica de almacén de mantenimiento
<b>SGBS <sup>17</sup></b>	Derivado del tejido adiposo subcutáneo de un lactante de 3 meses con síndrome de Simpson-Golabi-Behmel. Se utiliza para estudiar la adipogénesis. Metabólicamente distinto de los adipocitos primarios
Células humanas primarias	
<b>Preadipocitos primarios <sup>14</sup></b>	Las células primarias, representan el modelo más fisiológico de precursores adiposos. Conservan sus características de depósito de origen e individuales. Número limitado de pases celulares, no siempre accesibles fácilmente
Modelos animales in vivo	
<b>C. elegans <sup>19</sup></b>	Se utiliza para estudiar los factores implicados en la saciedad alimentaria
<b>D. melanogaster <sup>19</sup></b>	Se utiliza para estudiar las vías neuronales implicadas en los depósitos de grasa
<b>D. rerio <sup>19</sup></b>	Modelo de uso frecuente para el estudio de la biología del tejido adiposo y las enfermedades relacionadas con la obesidad
<b>Zucker crías de rata <sup>20</sup></b>	Se utiliza para estudiar el crecimiento del TA desde la lactancia hasta las etapas de la pubertad
<b>Roedores de camada pequeña <sup>23</sup></b>	Mejor modelo para estudiar la adiposidad infantil y la aparición posterior de enfermedades metabólicas que los roedores de camada grande

pueden ofrecer una visión de la predisposición a medida que cambian en respuesta a factores ambientales, como la actividad física o la nutrición, y difieren entre las distintas etnias. Un ejemplo es la modificación epigenética de los circuitos de alimentación hipotalámicos en la descendencia cuando se somete a estrés a la madre durante el embarazo o al niño/a durante los períodos postnatales. Esta alteración conduce a cambios en la expresión de los neuropéptidos, afectando la regulación del comportamiento alimentario <sup>23</sup>.  
<sup>24</sup>. Como resultado, el metabolismo energético se altera en la descendencia aumentando su susceptibilidad a desarrollar obesidad y síndromes metabólicos en la edad adulta<sup>23</sup>. Estas modificaciones epigenéticas incluyen mutaciones en los

promotores genéticos asociados con la regulación del apetito y el estrés. Además, las experiencias adversas durante la primera infancia pueden conducir a la metilación del ADN en los genes asociados con la obesidad<sup>23,25</sup>.

La metilación del ADN del gen del factor respiratorio nuclear 1 (NRF1) en un dinucleótido CpG crucial se correlacionó firmemente con la aparición de obesidad a los 3-5 años en niños hispanos no obesos. Sin embargo, no se han reportado datos sobre otras etnias<sup>26</sup>.

Si bien la influencia de las madres en la transmisión del riesgo de obesidad a sus hijos ha sido ampliamente estudiada<sup>23,24,27,28</sup>, solo unos pocos estudios han evaluado la contribución potencial de los padres al desarrollo de

la obesidad de sus hijos<sup>27,29</sup>. Sin embargo, investigaciones recientes indican que las intervenciones dirigidas a reducir la obesidad en los hombres, como el ejercicio y la pérdida de peso, pueden tener un impacto positivo en la calidad de los espermatozoides y alterar los patrones de metilación del ADN en los espermatozoides<sup>27</sup>. Con el fin de obtener una comprensión integral de los mecanismos intergeneracionales subyacentes involucrados en la exposición temprana en seres humanos, es crucial que las investigaciones futuras aborden los estudios epigenéticos y epidemiológicos maternos y paternos. El estudio de todos estos factores en detalle ayudará al establecimiento de modelos confiables para el estudio de la obesidad infantil, incluidos los modelos celulares de niños y los modelos animales.

## Conclusiones y perspectivas futuras

La obesidad y las enfermedades metabólicas asociadas, como la diabetes, la resistencia a la insulina, las enfermedades cardiovasculares, el asma, y algunos tipos de cáncer, son cada vez más prevalentes en todo el mundo. Esto es especialmente preocupante entre personas cada vez más jóvenes. Es importante destacar que la investigación sobre la obesidad se ha centrado en gran medida en los adultos y se ha pasado por alto en los niños. Los modelos *in vivo* e *in vitro* para estudiar la obesidad infantil siguen siendo muy limitados. Por lo tanto, se requieren modelos experimentales para estudiar el TA en la obesidad infantil para dilucidar marcadores precisos de predicción temprana y, en última instancia, estrategias de prevención apropiadas.

## Referencias

1. Obesity and overweight. Accessed February 21, 2023. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
2. Kershaw EE, Flier JS. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. Published online 2004. doi:10.1210/jc.2004-0395
3. Von Bank H, Kirsh C, Simcox J. Aging Adipose: Depot Location Dictates Age-Associated Expansion and Dysfunction. doi:10.1016/j.arr.2021.101259
4. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 2004;84(1):277-359. doi:10.1152/PHYSREV.00015.2003
5. Cheng L, Wang J, Dai H, et al. Brown and beige adipose tissue: a novel therapeutic strategy for obesity and type 2 diabetes mellitus. *Adipocyte.* 2021;10(1):48-65. doi:10.1080/21623945.2020.1870060
6. Giordano A, Smorlesi A, Frontini A, Barbatelli G, Cinti S. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. *Eur J Endocrinol.* 2014;170(5):R159-R171. doi:10.1530/EJE-13-0945
7. Reilly JJ. Obesity in childhood and adolescence: evidence based clinical and public health perspectives. *Postgrad Med J.* 2006;82:429-437. doi:10.1136/pgmj.2005.043836
8. Takahashi H, Menendez A, Wanczyk H, et al. Obesity and Adipose Tissue Dysfunction: From Pediatrics to Adults. Published online 2022. doi:10.3390/genes13101866
9. Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, Kim JI, Kim JB. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2016;7(APR). doi:10.3389/FENDO.2016.00030
10. Knittle JL, Timmers K, Ginsberg-Fellner F, Brown RE, Katz DP. The Growth of Adipose Tissue in Children and Adolescents CROSS-SECTIONAL AND LONGITUDINAL STUDIES OF ADIPOSE CELL NUMBER AND SIZE.
11. Poissonnet CM, LaVelle M, Burdi AR. Growth and development of adipose tissue. *J Pediatr.* 1988;113(1 PART 1):1-9. doi:10.1016/S0022-3476(88)80520-1
12. Frigolet ME, Gutiérrez-Aguilar R. The colors of adipose tissue. *Gac Med Mex.* 2020;156(2):142-149. doi:10.24875/GMM.M20000356
13. Reyes-Farias M, Fos-Domenech J, Serra D, Herrero L, Sánchez-Infantes D. White adipose tissue dysfunction in obesity and aging. *Biochem Pharmacol.* 2021;192. doi:10.1016/j.BCP.2021.114723
14. Lee MJ, Fried SK. Optimal Protocol for the Differentiation and Metabolic Analysis of Human Adipose Stromal Cells. Published online 2014. doi:10.1016/B978-0-12-800280-3.00004-9
15. Ruiz-Ojeda FJ, Rupérez AI, Gomez-Llorente C, Gil A, Aguilera CM. Molecular Sciences Cell Models and Their Application for Studying Adipogenic Differentiation in Relation to Obesity: A Review. doi:10.3390/ijms17071040
16. Darimont C, Zbinden I, Avanti O, et al. Reconstitution of telomerase activity combined with HPV-E7 expression allow human preadipocytes to preserve their differentiation capacity after immortalization. *Cell Death Differ.* 2003;10:1025-1031.



doi:10.1038/sj.cdd.4401273

17. Todor Cevi C M, Hilton C, Mcneil C, et al. A cellular model for the investigation of depot specific human adipocyte biology.

Published online 2017. doi:10.1080/21623945.2016.1277052

18. Fischer-Posovszky P, Newell FS, Wabitsch M, Tornqvist HE. Human SGBS Cells – a Unique Tool for Studies of Human Fat Cell Biology. *Obes Facts*. 2008;1(4):184-189.

doi:10.1159/000145784

19. Yeo CR, Agrawal M, Hoon S, et al. SGBS cells as a model of human adipocyte browning: A comprehensive comparative study with primary human white subcutaneous adipocytes OPEN. doi:10.1038/s41598-017-04369-2

20. Dey SK, Senapati S. In Vivo Models for Obesity and Obesity Related Carcinogenesis. *Obesity and Cancer*. Published online 2021:279-300. doi:10.1007/978-981-16-1846-8\_14

21. Pouteau E, Turner S, Aprikian O, et al. Time course and dynamics of adipose tissue development in obese and lean Zucker rat pups. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32(4):648-657. doi:10.1038/SJ.IJO.0803787

22. Gulyaeva O, Dempersmier J, Sul HS. Genetic and Epigenetic Control of Adipose Development. doi:10.1016/j.bbaliip

23. López-Taboada I, González-Pardo H, Conejo NM. Western Diet: Implications for Brain Function and Behavior. *Front Psychol*. 2020;11. doi:10.3389/FPSYG.2020.564413/FULL

24. Miller AL, Lumeng JC. Pathways of Association from Stress to Obesity in Early Childhood. *Obesity*. 2018;26:1117-1124. doi:10.1002/oby.22155

25. Rushing A, Sommer EC, Zhao S, Po'e EK, Barkin SL. Salivary epigenetic biomarkers as predictors of emerging childhood obesity. doi:10.1186/s12881-020-0968-7

26. Rushing A, Sommer EC, Zhao S, Po'e EK, Barkin SL. Salivary epigenetic biomarkers as predictors of emerging childhood obesity. doi:10.1186/s12881-020-0968-7

27. Lin J, Gu W, Huang H. Effects of Paternal Obesity on Fetal Development and Pregnancy Complications: A Prospective Clinical Cohort Study. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13. doi:10.3389/FENDO.2022.826665/FULL

28. Entringer S, Buss C, Swanson JM, et al. Fetal Programming of Body Composition, Obesity, and Metabolic Function: The Role of Intrauterine Stress and Stress Biology. *J Nutr Metab*. 2012;2012:16. doi:10.1155/2012/632548

29. Shawe J, Delbaere I, Ekstrand M, et al. Preconception care policy, guidelines, recommendations and services across six European countries: Belgium (Flanders), Denmark, Italy, the Netherlands, Sweden and the United Kingdom. *Eur J*

*Contracept Reprod Health Care*. 2015;20(2):77-87. doi:10.3109/13625187.2014.990088

©2023 seco-seedo. Publicado por bmi-journal.

Todos los derechos reservados.

