

TESIS DOCTORAL 2015

PROGRAMACIÓN METABÓLICA ASOCIADA AL EXCESO DE GRASA CORPORAL. EFECTOS DE LA REVERSIÓN DE LA DIETA DE CAFETERÍA (MODELO DE POSTCAFETERÍA) ANTES DE LA GESTACIÓN SOBRE LA DESCENDENCIA Y EFECTOS DIRECTOS DE LA DIETA EN RATAS JÓVENES

Heriberto Castro García



TESIS DOCTORAL 2015

Programa Doctoral en Nutrigenómica y Nutrición Personalizada

PROGRAMACIÓN METABÓLICA ASOCIADA AL EXCESO DE GRASA CORPORAL. EFECTOS DE LA REVERSIÓN DE LA DIETA DE CAFETERÍA (MODELO DE POSTCAFETERÍA) ANTES DE LA GESTACIÓN SOBRE LA DESCENDENCIA Y EFECTOS DIRECTOS DE LA DIETA EN RATAS JÓVENES

Heriberto Castro García

Director: Prof. Andreu Palou Oliver Directora: Dra. Juana Sánchez Roig

Doctor por la Universidad de las Islas Baleares

Los directores	de	Tesis	Doctoral
----------------	----	-------	----------

Prof. Andreu Palou Oliver Catedrático de Universidad De Bioquímica y Biología Molecular Dra. Juana Sánchez Roig Investigadora Ramón Y Cajal Laboratorio de Biología Molecular, Nutrición y Biotecnología

El interesado

Sr. Heriberto Castro García

Agradecimientos

"Siempre parece imposible, hasta que se hace"

Nelson Mandela

En primer lugar agradecer a mis tutores de tesis, el Prof. Andreu Palou Oliver y la Dra. Juana Sánchez Roig, por darme la oportunidad de formar parte de su excelente equipo de trabajo. Prof. Andreu Palou, ha sido un honor escuchar sus palabras de apoyo profesional, que me han permitido fortalecerme como investigador y a visualizar la vida laboral de una mejor manera

Gracias Joana, porque me considero afortunado de tenerte como tutora de mi tesis, eres una persona que admiro y respeto por tu profesionalismo y sabiduría en este mundo de la investigación. Me has enseñado que no hay límites para crecer en la vida, que para tener éxito es solo a través del esfuerzo, la dedicación y la perseverancia, de no bajar nunca los brazos ante las adversidades. Por tus consejos que son parte de mi formación profesional. Por esas palabras de aliento que se necesitan para seguir adelante y conseguir una meta sin mirar atrás. Por tus enseñanzas que son un legado para mí y que lo serán para quien pueda transmitirlas en un futuro. Por todo eso y más, muchas gracias.

Gracias Maestra Hilda Novelo Huerta, porque sin su apoyo no habría alcanzado esta meta tan importante en mi formación profesional, ha sido un orgullo representar a la Facultad de Salud Pública y Nutrición (FaSPyN).

Gracias a los profesores y doctores del LBNB, Dra. Paula Oliver, Dra. Ana María Rodríguez, Dra. Catalina Picó, Dra. Luisa Bonet, Dra. Francisca Serra, Dr. Joan Ribot, Dra. Mariona Palou, Dra. Teresa Priego, Dr. Pep Mercader por compartir sus conocimientos y experiencias laborales. Enzo, por estar siempre al pendiente de mis dudas. Sin ustedes esto no habría sido posible. Gracias Ona por permitirme aprender de tu cátedra y tu motivación que me ha mostrado el camino para hacer que las cosas resulten de la mejor manera.

Agradecer especialmente al Dr. Toni Caimari el apoyo que me brindó durante mi estancia en el Master y que abrió las puertas para invitarme a seguir creciendo en esta difícil pero gratificante etapa doctoral.

Un agradecimiento especial a Bea, técnico de nuestro laboratorio, a Teresa y Miguel por su apoyo dentro del estabulario ya que su trabajo es parte vital de nuestras investigaciones.

Gracias a mis amigos en México que con sus palabras de motivación y aliento han hecho que la distancia sea una mera imaginación. Mine, Viri, Carmen, Issa, el estar lejos te hace valorar muchas cosas, entre ellas la amistad, gracias por ser parte de esto. Pily, conoces mi historia, estuviste apoyándome desde el principio de esto, gracias por estar ahí desde entonces y gracias por estar ahora. A mis demás amigos, Gera, Raquel, Laura, Jatz, Paty, Ana que han estado conmigo en las buenas y en las malas y que conocen que este es el resultado de un trabajo constante que inició hace más de doce años y que no termina aquí, continuará, y seguramente los seguiré teniendo a mi lado.

A mis compañeros de laboratorio, Bárbara, Marina, Petar, Nora, Alice, Rubén, Jani, mi paisana Estefanía por guiarme dentro del laboratorio desde los primeros días de trabajo. Nara, Xisco, Alba, Marga, Madhu, Cati, Andrea, por atender mis dudas de trabajo y por permitirme ser parte de su día a día dentro y fuera del laboratorio.

Jani, prometo aprender a bailar mejor la próxima vez. Petar, gracias por compartir tus conocimientos y tu casa también. Cati, siempre he dicho que una sonrisa provoca alegría en los demás, sigue así, provocando y contagiando de alegría a donde quiera que vayas.

Raúl mi compañero de despacho y de vivencias que se quedan grabadas para siempre, gracias por tu amistad y tu apoyo, al libro de historias aún le quedan páginas en blanco, habrá que seguir escribiendo.

Gracias Sebastià, me has dado un curso intensivo de Mallorquín y ayudado a no estar tan "estressat", haciendo que los días sean más agradables.

Albert, mención especial, gracias por los ánimos en los momentos más intensos de la tesis, eres parte de este trabajo.

A mis compañeros del LBNB, gracias por todo eso, pero sobre todo gracias por permitirme ser digno de su amistad. No es una despedida, simplemente es un hasta pronto.

Este trabajo de tesis está dedicado a mis padres, que son los pilares fundamentales de mi vida, he sido testigo principal del sacrificio que han hecho para que yo salga adelante. Desde aquellos días en los que tuve que dejar mi casa para buscar un sueño que tanto ustedes como yo anhelábamos, que a pesar de estar lejos siempre recibí palabras de apoyo. Sabiendo que en su corazón había tristeza por la distancia, siempre vi en ustedes una sonrisa. Son parte de mis logros y mi vida será dedicada solo para llenarlos de orgullo.

ÍNDICE

Agradecimientos	I
Abreviaturas	V
Resumen	VII
Lista de artículos originales derivados de la tesis	XIII
1. Introducción general	1
1.1. La obesidad y el síndrome metabólico	3
1.2. Programación metabólica	4
1.2.1. Efectos de la obesidad materna durante la gestación en el desarrollo de enfermedades en la descendencia	5
1.2.2. Efecto de la obesidad materna durante la lactancia en el desarrollo de enfermedades en la descendencia	6
1.2.3. Efecto restricción calórica antes del embarazo en la progenie	7
1.3. Componentes bioactivos de la leche materna	9
1.3.1. Leptina	10
1.3.2. Adiponectina	11
1.3.3. Irisina	12
1.4. Homeostasis energética y metabolismo lipídico	14
1.4.1. Control central de la ingesta	15
2. Objetivos y planteamiento experimental	17
3. Materiales y métodos	27
3.1. Experimentación Animal	29
3.1.1. Composición de la dieta	29
3.1.2. Obtención de muestras de leche	30
3.1.3. Extracción de muestras de sangre in vivo	30
3.2. Extracción de ARN	30
3.3. Análisis de RT-PCR a tiempo real	32
3.3.1. Retrotranscripción	32
3.3.2. PCR a tiempo real	33
3.4. Cuantificación de lípidos hepáticos	34
3.5. Determinación de la concentración de glucosa	35
3.6. Determinación de la concentración de insulina	35
3.7. Determinación del índice HOMA-IR	36
3.8. Determinación de la concentración de Leptina	36
3.9. Determinación de la concentración de Adiponectina	37
3.10. Determinación de la concentración de Irisina	37
3.11. Determinación de ácidos grasos libres circulantes	38
3.12. Determinación de triglicéridos circulantes	38
3.13. Determinación del β-Hidroxibutirato circulante	39
3.14. Western blot	39
3.15. Análisis estadístico	42

4. Resultados	43
4.1. Capítulo 1	45
4.1.1. Resultados	46
4.1.2. Discusión	55
4.1.3. Conclusiones	58
4.2. Capítulo 2	59
4.2.1. Resultados	60
4.2.2. Discusión	66
4.2.3. Conclusiones	69
4.3. Capítulo 3	71
4.3.1. Resultados	72
4.3.2. Discusión	82
4.3.3. Conclusiones	85
4.4. Capítulo 4	87
4.4.1. Resultados	88
4.4.2. Discusión	100
4.4.3. Conclusiones	102
5. Recapitulación	105
6. Conclusiones	113
7. Referencias	117

Abreviaturas

Lista de las abreviaturas más comunes utilizadas durante la tesis:

Acc: Acetil-CoA carboxilasa

AMPK: Proteína quinasa activada por AMP (AMP-activated protein kinase)

ATGL: Triglicérido lipasa adiposa (*Adipose triglyceride lipase*)

ATP: Trifosfato de adenosina (*adenosine triphosphate*)

CCK: Colecistoquinina (*Cholecystokinin*)

Cd36: Molécula CD36 (receptor de la trombospondina) (*CD36 molecule /thrombospondin receptor*)

Cidea: Inductor de la muerte celular DFFA-como efector A (*Cell death-inducing DFFA-like effector a*)

CPT: Carnitina palmitoiltransferasa (*Carnitine Palmitoyl transferase*)

CPT1: Carnitina palmitoiltransferasa 1 (*Carnitine Palmitoyl transferase 1*)

Cpt1a: Carnitina palmitoiltransferasa 1a, hígado (*Carnitine palmitoyltransferase 1a, liver*)

Cpt1b: Carnitina palmitoiltransferasa 1b, músculo (*Carnitine palmitoyltransferase 1b, muscle*)

DAG: Diacilglicerol

DEPC: Dietilenpirocarbonato **EDTA:** Etildiaminotetracético

Fasn: Ácidos grasos sintetasa (*Fatty acid synthase*)

Fgf21: Factor de crecimiento de fibroblastos 21 (*Fibroblast growth factor 21*)

Gck: Glucoquinasa (*Glucokinase*)

Ghsr: Receptor de secretagogos de la hormona del crecimiento (*Growth hormone secretagogue receptor*)

HDL: Lipoproteína de alta densidad (*high density lipoproteín*)

Hk2: Hexoquinasa 2 (*Hexokinase 2*)

HOMA-IR: Modelo homeostático de evaluación de la resistencia a la insulina (*Homeostatic model assessment of insulin resistance*)

HSL: Lipasa sensible a hormonas (*Hormone-sensitive lipase*)

IMC: Índice de Masa Corporal

Insr: Receptor de insulina (*Insulin receptor*)

Irs1: Sustrato 1 del receptor de la insulina (*Insulin receptor substrate 1*)

Lep: Leptina (*Leptin*)

Lepr: Receptor de la leptina (*Leptin receptor*)

Lpl: Lipoproteína lipasa (*Lipoprotein lipase*)

MAG: Monoacilglicerol

Mest: Transcrito específico del mesodermo (*Mesoderm specific transcript*)

NEFA: Ácidos grasos no esterificados (*Non-esterified fatty acids*)

Npy: Neuropéptido Y (*Neuropeptide Y*)

Pdk4: Piruvato deshidrogenasa quinasa, isozima 4 (*Pyruvate dehydrogenase kinase*, *isozyme 4*)

Pnpla2 (**Atgl**): Patatin como la fosfolipasa de dominio que contiene 2 proteínas (*Patatin-like phospholipase domain containing* 2)

Pomc: Pro-opiomelanocortina (*Pro-opiomelanocortin*)

Ppara: Receptor alpha activado por el proliferador peroxisomal (*Peroxisome proliferator activated receptor alpha*)

Pparg: Receptor gamma activado por el proliferador peroxisomal (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*)

Scd1: Esteroil conezima A desaturasa 1 (*Stearoyl-Coenzyme A desaturase 1*)

Slc2a4: (GLUT4) Acarreador de soluto del grupo 2a4 (*Solute carrier family 2 member 4*)

SNC: Sistema nervioso central

SNP: Sistema nervioso parasimpático

Socs3: Supresor de la señalización de citoquinas 3 (*Suppressor of cytokine signaling 3*)

Srebf1: Factor de transcipción de unión al elemento regulador de esteroles 1 (*Sterol regulatory element binding transcription factor 1*)

Stat3: Transductor de señal y activador de la transcripción 3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*)

TAB: Tejido adiposo blanco

TBE: Tampón formado por Tris, Borato y EDTA

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad (*Very low density lipoprotein*)



Programación metabólica asociada al exceso de grasa corporal. Efectos de la reversión de la dieta de cafetería (modelo de postcafetería) antes de la gestación sobre la descendencia y efectos directos de la dieta en ratas jóvenes.

Programa de doctorado de Nutrigenómica y Nutrición Personalizada Universidad de las Islas Baleares

RESUMEN

El sobrepeso y la obesidad en la infancia y en la adolescencia se han asociado con un incremento en la tasa de mortalidad en edad adulta. Esto es más alarmante si tenemos en cuenta que la prevalencia de obesidad y sobrepeso en la infancia ha aumentado drásticamente en los últimos años. Además, la obesidad en la infancia no suele ser un trastorno benigno, pese a la creencia popular de que los niños con sobrepeso dejarán de tener este problema conforme avanza el crecimiento. Asimismo, también ha aumentado la incidencia de la obesidad en mujeres en edad fértil, lo que puede conllevar, no solo determinadas complicaciones durante el embarazo sino también trastornos en la salud de la descendencia, tanto a corto como a largo plazo. Existe una gran cantidad de recomendaciones nutricionales para disminuir la incidencia de riesgos durante el embarazo, con la finalidad de reducir el peso corporal antes del embarazo. Si bien, parece ser que no existe un consenso unánime en las recomendación de cómo y cuándo perder peso antes del embarazo. En todo caso, sí que es conveniente evitar la restricción calórica durante la gestación, ya que se sabe que esto puede producir efectos negativos en la descendencia. En esta tesis doctoral, el objetivo ha sido estudiar la programación metabólica asociada al exceso de grasa corporal tanto en etapas perinatales como en etapas tempranas. Por una parte, analizamos en ratas los efectos a corto plazo de la ingesta de una dieta obesogénica durante etapas tempranas. Por otro lado, quisimos determinar qué efecto produjo en la descendencia el que las madres hubieran pasado por un periodo de dieta de cafetería y obesidad aunque esté seguido de un periodo de reversión a dieta normal antes de la gestación.

En la presente tesis hemos estudiado el efecto de la exposición a un corto periodo de una dieta obesogénica (dieta de cafetería) en ratas jóvenes macho. Hemos observado que este periodo corto de ingesta de dieta de cafetería, a pesar de no producir cambios aparentes en el peso corporal, induce una acumulación de grasa corporal comparado con los animales control. Además, los animales alimentados con dieta de cafetería, presentaron una alta ingesta energética, hiperleptinemia y una alterada expresión de Npy en hipotálamo, que refleja una disfunción en el control de la ingesta, así como una alteración en la respuesta metabólica a las condiciones de ayuno y alimentación, en tejidos claves implicados en la homeostasis energética (tejido adiposo blanco retroperitoneal y el hígado).

Es conocido que la obesidad materna durante el embarazo y la lactancia predisponen a la obesidad y otros trastornos metabólicos en la descendencia en la edad adulta. En la presente tesis nos hemos planteado estudiar si los efectos perjudiciales esperados en la descendencia asociado a la obesidad dietética materna pueden ser revertidos con la eliminación de la dieta obesogénica en las madres antes de la gestación. Se ha utilizado principalmente la dieta de cafetería como dieta de engorde, ya que en ratas induce una hiperfagia persistente y el aumento de la ingesta de energía como resultado de la variedad, palatabilidad y la novedad de los alimentos disponibles, de manera similar a

los hábitos alimentarios y costumbres poco saludables observados en humanos. Esta dieta de cafetería se administró a ratas hembras desde el día 10 al día 100 de edad. Al final del periodo de ingesta de dieta de cafetería las ratas presentaron mayor peso y grasa corporal que las controles. Un mes antes de la gestación se eliminó la dieta de cafetería, sustituyéndola por una dieta estándar (modelo postcafetería). Al eliminar la dieta de cafetería se produjo una disminución en el peso y la grasa corporal, aunque permanecieron aumentados en el momento del apareamiento con un 8% y 13% de diferencia respectivamente en comparación con el grupo control. Durante el periodo de lactancia no se encontraron diferencias en el peso corporal entre los grupos; sin embargo, las madres postcafetería presentaron durante la lactancia mayor contenido de grasa corporal y de leptina en suero y leche. A partir de la semana 9 de vida, las crías de madres postcafetería presentaron menor peso corporal que las controles. A las 15 semanas de edad las crías de madres postcafetería no presentaron alteraciones en los parámetros bioquímicos analizados. Además, estudiamos la respuesta metabólica a los cambios en las condiciones de alimentación/ayuno en crías de madres postcafetería a edades tempranas (26 días de edad). Observamos que las crías macho de madres postcafetería presentan una menor expresión de genes lipogénicos (Pparg, Srebf1y Fasn) y lipolíticos (Pnpla2) en el tejido adiposo retroperitoneal comparada con la de las crías de madres control. Las crías hembra de madres postcafetería presentaron una menor expresión hepática de genes implicados en la lipogénesis comparada con la de las hembras control, aunque la respuesta al ayuno no estaba alterada. Por tanto, si se elimina la dieta de cafetería un mes antes de la gestación en madres con obesidad dietética, aunque sin llegar a producirse una reversión completa del exceso de peso corporal, aparentemente se pueden prevenir los efectos perjudiciales de la obesidad materna en el metabolismo lipídico de sus crías.

Más a largo plazo, los animales descendientes de madres del grupo postcafetería, tanto machos como hembras, presentaron una menor ingesta, ganancia de peso y un menor porcentaje de grasa corporal cuando son expuestas a una dieta obesogénica, comparado con las crías de madres control. Tras 2 meses de exposición a western diet las crías macho de madres postcafetería mostraron en el tejido adiposo blanco retroperitoneal, una disminución en la expresión de genes lipogénicos (Ppara, Srebf1, Fas), Pnpla2, Cpt1b, Insr, Lep y Mest, que no se observó en las crías de madres control. Además, también presentaron una menor expresión hipotalámica del neuropéptido orexigénico NPY, que puede explicar la menor ingesta observada en estos animales y una menor activación de la expresión de genes asociados a la lipogénesis hepática (Srebf1, Fas, Scd1) que puede explicar la menor acumulación de lípidos hepáticos observados en estos animales comparada con la de las crías de madres control. Por tanto, existe un fenómeno de programación metabólica, especialmente en la descendencia masculina, que podría ser atribuido a la eliminación de la dieta obesogénica a ratas con obesidad dietética un mes antes del embarazo, que ha generado un efecto protector en las crías en edad adulta frente a la ganancia de peso, acumulación de grasa, hiperfagia y acumulación hepática de lípidos aún después de la exposición a un ambiente obesogénico. Si lo pudiéramos trasladar a personas obesas que planifican quedar embarazadas, cabría recomendar una dieta equilibrada y la pérdida de al menos una parte del peso corporal durante unos meses antes de la gestación con el fin de que la descendencia goce de una programación metabólica saludable.



Programació metabòlica associada a l'excés de greix corporal. Efectes de la reversió de la dieta de cafeteria (model de postcafetería) abans de la gestació sobre la descendència i efectes directes de la dieta en rates joves.

Programa de doctorado de Nutrigenómica y Nutrición Personalizada Universidad de las Islas Baleares

RESUM

El sobrepès i l'obesitat durant la infància i l'adolescència s'han associat amb un increment en la taxa de mortalitat en edat adulta. Això és més alarmant si tenim en compte que la prevalença d'obesitat i sobrepès a la infància ha augmentat dràsticament en els últims anys. A més, l'obesitat a la infància no sol ser un trastorn benigne, malgrat la creença popular que els nens amb sobrepès deixaran de tenir aquest problema conforme avança el creixement. Així mateix, també ha augmentat la incidència de l'obesitat en dones en edat fèrtil, el que pot suposar, no només determinades complicacions durant l'embaràs sinó també trastorns en la salut de la descendència, tant a curt com a llarg termini. Existeix una gran quantitat de recomanacions nutricionals per disminuir la incidència de riscos durant l'embaràs, amb la finalitat de reduir el pes corporal abans de l'embaràs. Si bé, sembla ser que no existeix un consens unànime en les recomanació de com i quan perdre pes abans de l'embaràs. En tot cas, sí que és convenient evitar la restricció calòrica durant la gestació, ja que se sap que això pot produir efectes negatius a la descendència. En aquesta tesi doctoral, l'objectiu ha estat estudiar la programació metabòlica associada a l'excés de greix corporal tant en etapes perinatals com en etapes primerenques. En primer lloc, analitzem en rates els efectes a curt termini de la ingesta d'una dieta obesogénica durant etapes primerenques. D'altra banda, vam voler determinar quin efecte produeix a la descendència el que les mares haguessin passat per un període de dieta de cafeteria i obesitat encara que aquest hagi estat seguit d'un període de reversió a dieta normal abans de la gestació.

En aquesta tesi hem estudiat l'efecte de l'exposició a un curt període d'una dieta obesogénica (dieta de cafeteria) en rates joves mascle. Hem observat que aquest període curt d'ingesta de dieta de cafeteria, malgrat no produir canvis aparents en el pes corporal, indueix una gran acumulació de greix corporal comparat amb els animals control. A més, els animals alimentats amb dieta de cafeteria, van presentar una alta ingesta energètica, hiperleptinemia i una alterada expressió de Npy a hipotàlem, reflectint una disfunció en el control de la ingesta, així com una alteració en la resposta metabòlica a les condicions de dejuni i alimentació, en teixits claus implicats en l'homeòstasi energètica (teixit adipós blanc retroperitoneal i el fetge).

És conegut que l'obesitat materna durant l'embaràs i la lactància predisposen a l'obesitat i altres trastorns metabòlics a la descendència en l'edat adulta. En aquesta tesi ens hem plantejat estudiar si els efectes perjudicials esperats en la descendència associat a l'obesitat dietètica materna poden ser revertits amb l'eliminació de la dieta obesogénica de les mares abans de la gestació. S'ha utilitzat principalment la dieta de cafeteria com a dieta per engreixar, ja que en rates indueix una hiperfagia persistent i l'augment de la ingesta d'energia com a resultat de la varietat, palatabilitat i la novetat dels aliments disponibles, de manera similar als hàbits alimentaris i costums poc saludables observats

en humans. Aquesta dieta de cafeteria es va administrar a rates femelles des del dia 10 al dia 100 d'edat. Al final del període d'ingesta de dieta de cafeteria les rates van presentar major pes i greix corporal que les controls. Un mes abans de la gestació es va eliminar la dieta de cafeteria, substituint-la per una dieta estàndard (model postcafetería). En eliminar la dieta de cafeteria es va produir una disminució del pes i del greix corporal, encara que van romandre augmentats al moment de l'aparellament amb un 8% i 13% de diferència respectivament en comparació al grup control. Durant el període de lactància no es van trobar diferències en el pes corporal entre els grups; si be, les mares postcafetería van presentar durant la lactància major contingut de greix corporal i de leptina en sèrum i llet. A partir de la setmana 9 de vida, les cries de mares postcafetería van presentar menor pes corporal que les controls. A les 15 setmanes d'edat les cries de mares postcafetería no van presentar alteracions en els paràmetres bioquímics analitzats. A més, estudiàrem la resposta metabòlica als canvis en les condicions d'alimentació/dejuni en cries de mares postcafetería a edats primerenques (26 dies d'edat). Observàrem que les cries mascle de mares postcafetería presenten una menor expressió de gens lipogènics (Pparg, Srebf1 i Fasn) i lipolítics (Pnpla2) en el teixit adipós retroperitoneal comparada amb la de les cries de mares control. Les cries femella de mares postcafetería van presentar una menor expressió hepàtica de gens implicats en la lipogènesis comparada amb la de les femelles control, encara que la resposta al dejuni no estava alterada. Per tant, si s'elimina la dieta de cafeteria un mes abans de la gestació en mares amb obesitat dietètica, encara que sense arribar a produirse una reversió completa de l'excés de pes corporal, aparentment es poden prevenir els efectes perjudicials de l'obesitat materna en el metabolisme lipídic de les seves cries.

Més a llarg termini, els animals descendents de mares del grup postcafetería, tant mascles com femelles, van presentar una menor ingesta, guany de pes i un menor percentatge de greix corporal quan són exposades a una dieta obesogénica, comparat amb les cries de mares control. Després de 2 mesos d'exposició a una western diet les cries mascle de mares postcafetería van mostrar en el teixit adipós blanc retroperitoneal, una disminució en l'expressió de gens lipogènics (Ppara, Srebf1, Fas), Pnpla2, Cpt1b, InR, Lep i Mest, que no es va observar a les cries de mares control. A més, també van presentar una menor expressió hipotalàmica del neuropèptid orexigènic Npy, que pot explicar la menor ingesta observada en aquests animals, així com una menor activació de l'expressió de gens associats a la lipogènesis hepàtica (Srebf1, Fas, Scd1) que pot explicar la menor acumulació de lípids hepàtics observats en aquests animals comparat amb la de les cries de mares control. Per tant, existeix un fenomen de programació metabòlica, especialment en la descendència masculina, que podria ser atribuït a l'eliminació de la dieta obesogénica a rates amb obesitat dietètica un mes abans de l'embaràs, que ha generat un efecte protector en les cries en edat adulta enfront del guany de pes, acumulació de greix, hiperfagia i acumulació hepàtica de lípids encara després de l'exposició a un ambient obesogènic. Si això es pogués traslladar a persones obeses que planifiquen quedar embarassades, caldria recomanar una dieta equilibrada i la pèrdua d'almenys una part del pes corporal durant uns mesos abans de la gestació amb la finalitat de que la descendência gaudeixi d'una programació metabòlica saludable.



Metabolic programming associated with the excess of body fat. Effects of the removal of the cafeteria diet (postcafeteria model) before pregnancy on the offspring and direct effects of diet in young rats.

Doctoral Program in Nutrigenomics and Personalized Nutrition Universidad de las Islas Baleares

ABSTRACT

Overweight and obesity in childhood and adolescence have been associated with increased mortality rate in adulthood. This is more alarming if consider that the prevalence of obesity and overweight in children has risen dramatically in recent years. Moreover, obesity in childhood is not a benign disorder, despite the popular belief that overweight children leave this problem when they grow. In addition, it has also increased the incidence of obesity in women of childbearing age, which can lead not only to certain complications during pregnancy but also health disorders in their offspring, both in short and long term. There are a lot of nutritional recommendations to reduce the incidence of risk during pregnancy in order to reduce body weight before pregnancy. However, appears that there is no unanimous consensus on the recommendation on how and when lose the excess of weight before pregnancy. In any cases, it is desirable to avoid calorie restriction during pregnancy because it is known that this can produce negative effects on the offspring. In this doctoral thesis, the objective has been to study the metabolic programming associated with excess body fat in perinatal stages. On the one hand, we analyzed in rats the short term effects of the intake of an obesogenic diet at early stages. On the other hand, we wanted to determine the effects on the offspring of dams that has been exposed to cafeteria diet and obesity, although this followed a period of reversion to normal diet before pregnancy.

In this thesis we studied the effect of the exposure to a short period of an obesogenic diet (cafeteria diet) in young male rats. We have observed that this short cafeteria diet feeding, despite did not produce any apparent changes in body weight, induced an accumulation of body fat, compared to control animals. In addition, the animals fed with cafeteria diet had greater energy intake, hyperletinemia and altered expression of Npy in hypothalamus, reflecting a dysfunction in the control of food intake; they also showed an impaired metabolic response to fasting and feeding conditions in key tissues involved in energy homeostasis (white adipose tissue retroperitoneal and liver).

It is known that maternal obesity during pregnancy and lactation predispose to obesity and other metabolic disorders in offspring in adulthood. In this thesis we aimed to study whether the adverse effects expected in the offspring associated with maternal dietary obesity can be reversed with the removal of the obesogenic diet in mothers before pregnancy. The cafeteria diet has been mainly used as fattening diet, because induces in rats persistent hyperphagia and increased energy intake as a result of the variety, palatability and the novelty of the food available, similarly to unhealthy eating habits observed in humans. This cafeteria diet was administered to female rats from day 10 to day 100 of age. At the end of the period of cafeteria diet intake, the rats had higher body weight and body fat content than the controls. One month before pregnancy, the cafeteria diet was replaced with a standard diet (postcafeteria model). When cafeteria diet was removed, rats presented a decrease in body weight and body fat content, although remained an 8% and 13% respectively higher at mating compared with the

control group. During lactation, no differences were found in body weight between groups; however, postcafetería dams had higher body fat content and higher serum and milk leptin levels during lactation. From week 9 of life, the offspring of postcafetería dams had lower body weight than controls. At 15 weeks of age the offspring of postcafetería dams did not presented alterations in any of biochemical parameters analyzed. In addition, we study the metabolic response to changes in feeding/fasting conditions in postcafetería young pups at early age (26-day-old). We observed that male offspring of postcafetería dams had a lower expression of lipogenic (Pparg, Srebf1 and Fasn) and lipolytic genes (Pnpla2) in the retroperitoneal adipose tissue compared to the offspring of control dams. Female offspring of postcafeteria dams had a lower hepatic expression of genes involved in lipogenesis compared to control females, although the response to the in fasting condition was not impaired. Therefore, if the cafeteria diet is removed one month before pregnancy in mothers with a dietary induced obesity, apparently can prevent the harmful effects of the maternal obesity on metabolism lipid in their offsprings, although a complete reversion of the excess body weight is reached.

In the adult age, the offspring of the postcafetería dams both males and females, presented a lower food intake, lower weight gain and lower percentage of body fat when exposed to an obesogenic diet, compared to the offspring of control dams. After 2 months of exposure to western diet, male offspring of postcafetería dams showed in white retroperitoneal adipose tissue a decrease in the expression of lipogenic genes (Ppara, Srebf1, Fasn), Pnpla2, Cpt1b, Insr, Lep and Mest, which it was not observed in the offspring of control dams. In addition, they also had a lower hypothalamic expression of the orexigenic neuropeptide Npy, which may explain the lower intake observed in these animals and lover activation of gene expression associated with hepatic lipogenesis (Srebf1, Fasn, Scd1) that can explain the lower hepatic lipid accumulation observed in these animals compared to the offspring of control dams. Therefore, there is a phenomenon of metabolic programming, especially in male offspring, which could be attributed to the elimination one month before pregnancy of obesogenic diet to dietary induced obesity rats, which has generated a protective effect in the offspring in adulthood against weight gain, fat accumulation, hyperphagia and hepatic lipid accumulation even after exposure to an obesogenic environment. If we could apply this to obese people who plan to become pregnant, it would be important to recommend a balanced diet and the loss of at least part of the excess of body weight few months before pregnancy in order to assure that the offspring can have a healthy metabolic programming.

Lista de artículos originales derivados de la tesis

Esta tesis está basada en los siguientes manuscritos originales:

1.- Castro H., Pomar CA., Picó C., Sánchez J., Palou A. Cafeteria diet overfeeding in young male rats impairs the adaptive response to fed/fasted conditions and increases adiposity independent of body weight. International Journal of Obesity (2015) 39, 430–437; doi:10.1038/ijo.2014.125.

Factor de impacto: 5.004; 1r Cuartil y 1r Decil. Datos recogidos en el JCR2014

- 2.- Castro H., Pomar CA., Picó C., Sánchez J., Palou A. In rats, programed obesity predisposition in the progeny due to maternal dietary obesity can be avoidable by a period following the normal diet before mating. Manuscrito en preparación.
- 3.- Castro H., Sánchez J., Picó C., Palou A. Dietary control before pregnancy in rats previously made obese by cafeteria diet feeding prevents metabolic alterations in their offspring at early ages. Manuscrito en preparación.
- 4.- Castro H., Sánchez J., Picó C., Palou A. The normalization of the diet one month before pregnancy in diet induced obese rats improves the metabolic programming of their offspring, enhancing the resistance against an obesogenic environment, especially in males in adulthood. Manuscrito en preparación.

Contribución en cada uno de los manuscritos

Manuscrito 1: Llevé a cabo el manejo de animales (incluyendo la intervención dietética, seguimiento de peso, medida de grasa corporal y colaboración en el sacrificio). Realicé la extracción de ARN de los tejidos: hígado y tejido adiposo blanco retroperitoneal. Analicé la expresión de todos los genes de interés en estos tejidos así como los western blot y el análisis de los parámetros séricos. Participé en el análisis, interpretación y representación gráfica de los resultados, incluyendo el análisis estadístico.

Manuscrito 2: Llevé a cabo el manejo de animales para la obtención del modelo de postcafetería y una vez obtenidas las madres del grupo postcafetería, llevé a cabo el manejo de animales durante la gestación y la lactancia, así como el seguimiento de la descendencia hasta la edad adulta (incluyendo la intervención dietética, seguimiento de peso, medida de grasa corporal, extracción de sangre y leche y colaboración en el sacrificio). Realicé los análisis en parámetros sanguíneos y determiné los niveles de leptina, adiponectina e irisina en leche. Participé en el análisis, interpretación y representación gráfica de los resultados, incluyendo el análisis estadístico, así como participación en la escritura del primer borrador del manuscrito.

Manuscrito 3: Llevé a cabo el manejo de animales (incluyendo la intervención dietética, seguimiento de peso, medida de grasa corporal y colaboración en el sacrificio). Realicé la extracción de ARN de los tejidos: hipotálamo, hígado y TAB. Analicé la expresión de todos los genes y los parámetros séricos. Participé en el análisis, interpretación y representación gráfica de los resultados, incluyendo el análisis estadístico, así como participación en la escritura del primer borrador del manuscrito.

Manuscrito 4: Llevé a cabo el manejo de animales (incluyendo la intervención dietética con *western diet*, seguimiento de peso, medida de grasa corporal y colaboración en el sacrificio). Realicé extracción de ARN de los tejidos: hipotálamo, hígado y TAB. Analicé la expresión de todos los genes y los parámetros séricos. Participé en el análisis,

interpretación y representación gráfica de los resultados, incluyendo el análisis estadístico, así como participación en la escritura del primer borrador del manuscrito.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Introducción General

1.1. La obesidad y el síndrome metabólico

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud (OMS 2015). Se considera que la obesidad ha aumentado hasta tal grado que alcanza ya proporciones epidémicas. De hecho, según datos recientes recogidos por la OMS, desde 1980 los casos de obesidad se han doblado en todo el mundo (OMS 2015). En 2014, más de 1900 millones de adultos presentaron sobrepeso, de los que más de 600 millones fueron obesos; es decir, el 34% de la población mayor de 18 años tiene sobrepeso y el 13% obesidad (OMS 2015).

Paralelamente al incremento de sobrepeso y obesidad, existe también un aumento de las enfermedades asociadas a la obesidad, implicadas en el desarrollo del síndrome metabólico. El síndrome metabólico incluye una serie de alteraciones fisiológicas como: resistencia a la insulina y alteración de la tolerancia a la glucosa, dislipidemias e hipertensión (Cai and Liu 2012). Su diagnóstico también se puede dar cuando existen niveles elevados de triglicéridos y colesterol, bajos niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y valores altos de glucosa en situación de ayuno en plasma (Wilson, D'Agostino et al. 2005). A nivel clínico, el síndrome metabólico es una causa de morbilidad y mortalidad de enfermedades cardiovasculares (Esfahani, Movahedian et al. 2015). Además, está totalmente vinculado a la resistencia a la insulina, tendiendo un impacto negativo a nivel mundial sobre la incidencia de diabetes mellitus tipo 2(Luna-Luna, Medina-Urrutia et al. 2015). Entre las complicaciones de salud que afectan a diferentes órganos y sistemas se encuentran: hígado graso, enfermedades respiratorias y cáncer (Bonomini, Rodella et al. 2015). El síndrome metabólico puede deberse a factores genéticos en combinación con factores ambientales, como la ingesta excesiva de calorías y niveles reducidos de actividad física (Luna-Luna, Medina-Urrutia et al. 2015).

De acuerdo con la definición de síndrome metabólico, el impacto que éste genera sobre el riesgo cardiovascular y la mortalidad asociada, es importante para justificar la necesidad de un diagnóstico general y establecer medidas sanitarias para la prevención y tratamiento de los síntomas de este síndrome. Muchas investigaciones han centrado sus objetivos sobre la inflamación en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular y el papel que la inflamación puede tener en el desarrollo del síndrome metabólico (De la Torre 2004; Esfahani, Movahedian et al. 2015). Aplicando los criterios establecidos por la OMS para el diagnóstico del síndrome metabólico, se ha determinado que la prevalencia de este síndrome es de un 17% en la población europea y un 19,3% en la población española (De la Torre 2004).

Una de las mayores causas del síndrome metabólico es la obesidad (Vincent and Taylor 2006). Para contrarrestar esta causa y prevenir los problemas de salud que surgen en consecuencia, se podrían adoptar hábitos alimenticios más saludables, como el alto consumo de alimentos bajos en grasas saturadas y la ingesta de fibra dietética (Feldeisen and Tucker 2007) así como la promoción de una actividad física moderada. De hecho, en el control de la obesidad es importante la prevención, incluso es importante iniciar con la prevención de la obesidad en etapas tempranas ya que la obesidad ha incrementado en niños en edad escolar (Whitaker 2004).

El sobrepeso y la obesidad en la infancia y en la adolescencia se han asociado con un incremento en la tasa de mortalidad en edad adulta (Krebs, Himes et al. 2007). En Estados Unidos el número de niños con sobrepeso se triplicó entre 1980 y 2000 (Daniels, Arnett et al. 2005), y según los últimos datos recogidos por la OMS en 2013, más de 42 millones de niños menores de 5 años tenían sobrepeso (OMS 2015).

La obesidad en la infancia no suele ser un trastorno benigno, pese a la creencia popular de que los niños con sobrepeso dejarán de tener este problema conforme avanza el crecimiento. Cuanto mayor tiempo se haya padecido sobrepeso durante la infancia, más probabilidades habrá de que continué con esta alteración hasta la adolescencia y la adultez. Los niños que desarrollan un nivel elevado de adiposidad durante el crecimiento antes de los cinco años y medio tienen mayor tendencia a padecer obesidad que aquellos niños cuyo desarrollo de adiposidad se presenta después de los siete años de edad (Krause, Mahan et al. 2005). La obesidad en niños en edad escolar va ligada a una serie de problemas de salud que pueden manifestarse como graves consecuencias en etapas adultas tales como hipertensión, diabetes tipo 2, dislipidemias y enfermedades cardiovasculares (Sabin and Kiess 2015).

Este incremento de los casos de obesidad es, en gran medida, provocado por la falta de actividad física y por un consumo energético descontrolado (Scheers, Philippaerts et al. 2012). Tanto la calidad como la cantidad de los alimentos que se consumen pueden constituir uno de los principales factores en el desarrollo de enfermedades asociadas con la obesidad.

Además, considerando la prevención de la obesidad desde etapas tempranas de la vida, existen evidencias que destacan la importancia de la nutrición en las primeras etapas de la vida (nutrición fetal y durante la lactancia) en la prevención de la obesidad en la edad adulta (Martorell, Stein et al. 2001; Pico, Palou et al. 2012). Tanto el exceso como la deficiencia de nutrientes durante etapas tempranas como la gestación y la lactancia pueden desencadenar una serie de alteraciones epigenéticas que se pueden manifestar a lo largo del desarrollo del individuo (Jimenez-Chillaron, Diaz et al. 2012; Yu, Han et al. 2013). En este sentido, cada vez está más claro que la nutrición materna durante la gestación y/o la lactancia, así como la nutrición en edades tempranas, puede tener consecuencias a largo plazo en la salud metabólica (Barker 1990; Pico, Palou et al. 2012). La hipótesis de sobrenutrición fetal sugiere que el aumento de adiposidad durante la etapa gestacional puede llegar a provocar cambios en el metabolismo energético y en el control del apetito del sistema endócrino fetal, y esto predispone un mayor riesgo de obesidad en etapa adulta (Lawlor, Smith et al. 2007; Sanchez, Priego et al. 2012; Llopis, Sanchez et al. 2014). Por tanto, la obesidad durante el embarazo es uno de los focos de atención, debido a factores de riesgo latentes tanto para la madre como para el recién nacido.

1.2. La programación metabólica

En humanos como en otros mamíferos, la mayor parte del proceso de división celular, ocurre durante la vida fetal, lo que aumenta la importancia de que existan condiciones óptimas dentro del útero. El desarrollo intrauterino es dependiente de la nutrición materna, así como de procesos hormonales y metabólicos (Desai, Beall et al. 2013). El concepto de "programación", establece que las condiciones presentes durante el periodo gestacional pueden programar alteraciones en el sistema fisiológico, las cuales también interfieren en el proceso de desarrollo de tejidos y órganos importantes provocando

cambios irreversibles en la estructura y función corporal (Alfaradhi and Ozanne 2011; Martin-Gronert and Ozanne 2013).

En este sentido, estudios epidemiológicos en humanos y estudios en animales han mostrado que la nutrición perinatal afecta a la susceptibilidad a desarrollar enfermedades crónicas relacionadas con la dieta en la edad adulta, incluyendo la enfermedad cardiovascular, la diabetes de tipo 2, la obesidad y el cáncer (Langley-Evans 1999). En particular, tanto la desnutrición como la sobrealimentación durante el embarazo tienen efectos potencialmente adversos sobre la adiposidad de los hijos en la edad adulta (Martorell, Stein et al. 2001). De hecho, existen una serie de estudios que han relacionado la obesidad materna con síntomas predecibles del síndrome metabólico Aún se desconocen los mecanismos exactos por los cuales la obesidad de la madre durante el embarazo puede programar alteraciones metabólicas en las crías. No obstante, se ha comprobado que una dieta elevada en grasas durante el embarazo ocasiona un aumento en el nivel de triglicéridos hepáticos y daño oxidativo en el feto, provocando incluso, que estas alteraciones se mantengan en las primeras etapas del desarrollo (McCurdy, Bishop et al. 2009). Otros estudios indican que la calidad de la dieta en mujeres con sobrepeso u obesidad se relacionada directamente con el crecimiento fetal y en el riesgo de desarrollar una ganancia de peso acelerada en etapas tempranas (Symonds, Mendez et al. 2013). Además, una sobrealimentación en etapas tempranas puede alterar de manera permanente la regulación de la ingesta de alimentos e incrementar significativamente la susceptibilidad al desarrollo de obesidad (Martin-Gronert and Ozanne 2013).

1.2.1. Efectos de la obesidad materna durante la gestación en el desarrollo de enfermedades en la descendencia

La obesidad durante el embarazo ha aumentado considerablemente, en paralelo al incremento de obesidad en la población general, en países desarrollados. Este hecho es de especial preocupación ya que la obesidad materna es un factor de riesgo importante que puede afectar el proceso del embarazo y la salud de la madre y del recién nacido, incluso lo predispone para padecer trastornos metabólicos en etapas adultas (Matusiak, Barrett et al. 2014). En cuanto a riesgos para la madre relacionados con la obesidad durante el embarazo se ha observado una mayor incidencia de diabetes gestacional e hipertensión (Matusiak, Barrett et al. 2014). Además, el aumento de peso gestacional se relaciona positivamente con la retención del peso después del parto (Krause, Mahan et al. 2005). Por otro lado, la obesidad materna durante el embarazo se ha relacionado con complicaciones en el neonato (Figura 1.1). Por ejemplo, la obesidad durante el embarazo puede resultar en partos prematuros y una mayor mortalidad en etapas tempranas fetales o tardías cuando se trata de una madre primeriza. A parte de las complicaciones asociadas con la obesidad materna durante la etapa fetal o en el momento del nacimiento, existen otras complicaciones relacionadas con factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades en la edad adulta. Además de la obesidad materna, la ingesta de una dieta rica en grasa durante la gestación per se, sin que exista obesidad materna también contribuye a un incremento de la incidencia de obesidad en la descendencia (White, Purpera et al. 2009). Además los efectos deletéreos de la ingesta de una dieta rica en grasa, dependen, no sólo de la cantidad total de grasa si no del tipo de grasa que se ingiere (Llopis, Sanchez et al. 2014).

No se conocen en profundidad los mecanismos por los cuales la obesidad materna durante la gestación produce estos efectos negativos. Pero se cree que alteraciones en vías metabólicas relacionadas con el control del apetito y mecanismos periféricos que regulan la sensibilidad a la insulina, podrían ser los responsable. A nivel más molecular, tanto los procesos que aumentan el estrés oxidativo, la inflamación y determinadas modificaciones epigenéticas podrían contribuir en la transmisión de enfermedades metabólicas de la madre al hijo (Rkhzay-Jaf, O'Dowd et al. 2012).

En la actualidad existen un gran número de recomendaciones nutricionales para el embarazo, entre las que se incluyen una dieta balanceada y equilibrada y rutinas de ejercicio; sin embargo no se han establecido recomendaciones que incluyan una pérdida de peso antes de la gestación lo que sería más compatible con la salud reproductiva.

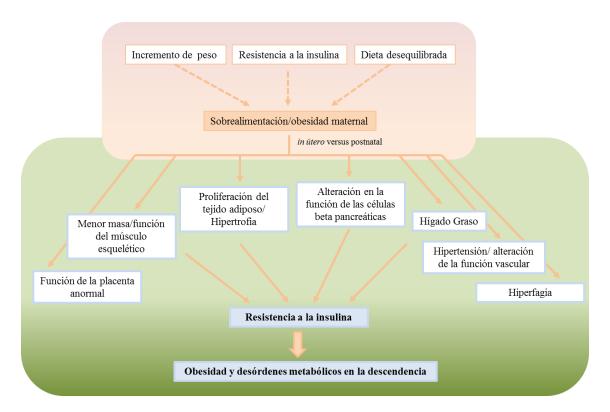


Figura 1.1. Efectos de la obesidad y/o sobrealimentación materna en la programación metabólica de la obesidad y desórdenes asociados en la descendencia. Adaptado de (Alfaradhi and Ozanne 2011)

1.2.2. Efecto de la obesidad materna durante la lactancia en el desarrollo de enfermedades en la descendencia

Las complicaciones de la obesidad durante la gestación no terminan en el momento del parto, siguen generando complicaciones durante la lactancia. Por ejemplo, se ha descrito que la obesidad materna un mes después del parto es un factor de riesgo para la interrupción temprana de la lactancia materna (Rutishauser and Carlin 1992). De hecho, las madres con obesidad o sobrepeso interrumpen la lactancia antes que las madres con peso normal (Hilson, Rasmussen et al. 1997; Donath and Amir 2000; Li, Jewell et al. 2003). Esto puede ser debido a que las madres con sobrepeso u obesidad pueden tener complicaciones con el inicio de la lactancia al interrumpir la producción normal de leche. Ello podría suponer graves consecuencias para la descendencia, ya que tanto la falta de lactancia materna como la corta duración de ésta se han asociado con el desarrollo de obesidad en la descendencia (Lepe, Bacardi Gascon et al. 2011). Se sabe

que la alimentación durante la lactancia con leche materna, comparado con la alimentación con leches artificiales, se ha asociado con un menor riesgo a desarrollar obesidad durante la infancia tardía y la adolescencia, por tanto la interrupción temprana de la lactancia materna puede tener consecuencias más a largo plazo en la descendencia.

En ratones con obesidad inducida por la dieta se han observado numerosas anomalías relativas a la función de la glándula mamaria, como una disminución de los conductos de la glándula mamaria y el incremento del tejido adiposo en este tejido durante la gestación (Flint, Travers et al. 2005). Además, también se producen alteraciones en la composición de la leche, como por ejemplo, una menor expresión de la β-caseína y baja producción de α-lactoalbúmina, lo que puede suponer, para el recién nacido, una deficiencia nutrimental básica para su desarrollo. Según estudios en animales el volumen de leche se ve afectado con una menor producción después de la exposición a una dieta elevada en grasa, y en sus crías la tasa normal de crecimiento se ve alterada aumentando incluso el riesgo de mortalidad (Rolls and Rowe 1982; Rasmussen, Wallace et al. 2001).

En rasgos generales, la obesidad maternal o la ingesta de dietas ricas en grasas durante la gestación y también en la lactancia tienen efectos negativos en la salud de la descendencia. La crías de madres alimentadas con dieta de cafetería durante la lactancia presentan una mayor adiposidad y peso corporal que las controles (Guo and Jen 1995; Bayol, Simbi et al. 2005; Buckley, Keseru et al. 2005; Bayol, Simbi et al. 2010). Además de las alteraciones en peso y grasa corporal, las crías de madres alimentadas con dietas ricas en grasa presentan alteraciones semejantes a las del síndrome metabólico en humanos (Armitage, Taylor et al. 2005). Estos animales presentan un aumento de la presión arterial (Khan, Taylor et al. 2003), una alterada homeostasis de la glucosa y de lípidos en suero (Guo and Jen 1995; Taylor, McConnell et al. 2005). También se ha visto que estos animales son más propensos al desarrollo de esteatosis hepática (Bruce, Cagampang et al. 2009; Gregorio, Souza-Mello et al. 2010).

Cabe destacar que estos efectos negativos, dependen no de la cantidad de grasa total *per se* sino del tipo de grasa. La sobreingesta materna de mantequilla, comparado con la sobreingesta de aceite de oliva o margarina, produce efectos más deletereos en la descendencia (Sanchez, Priego et al. 2012; Llopis, Sanchez et al. 2014). Se ha observado que las crías de madres que recibieron una suplementación del 30% en forma de mantequilla eran más propensan a desarrollar esteatosis hepática que las crías de madres suplementadas con la misma candida de aceite de oliva o margarina (Llopis, Sanchez et al. 2014).

Por tanto, una exposición temprana a un exceso de grasa saturada puede tener efectos negativos tardíos en la salud metabólica de la descendencia, especialmente si esta exposición se produce durante la vida fetal y la infancia, ya que son períodos de gran vulnerabilidad a factores externos.

1.2.3. Efecto restricción calórica antes del embarazo en la progenie

Como se ha comentado, actualmente la obesidad materna es un foco de atención por su implicación en complicaciones metabólicas tanto para la madre como para el recién nacido (Wang, Davies et al. 2002; Bellver, Rossal et al. 2003; McIntyre, Gibbons et al. 2012). Existen algunos estudios que recomiendan tener un índice de masa corporal (IMC) en rangos normales antes del embarazo. Se ha sugerido que el perder peso antes del embarazo previene las complicaciones asociadas a la obesidad materna durante la

gestación (Glazer, Hendrickson et al. 2004; Getahun, Ananth et al. 2007; Ehrlich, Hedderson et al. 2011). Una pérdida de peso (4,5 Kg) antes del embarazo se asocia con un menor riesgo de diabetes gestacional (Glazer, Hendrickson et al. 2004). Incluso se ha observado que los hijos de mujeres que se han sometido a cirugía bariátrica para la pérdida de peso, presentan una mayor sensibilidad a la insulina y mejor perfil lipídico comparado con sus hermanos que nacieron antes de dicha cirugía (Kral, Biron et al. 2006; Smith, Cianflone et al. 2009). No obstante, la vigilancia metabólica de niños que han nacido después de una pérdida de peso materno antes del embarazo es aun escasa.

Por otra parte, también es importante tomar en cuenta algunos posibles riesgos asociados con la pérdida de peso antes del embarazo, ya que es importante considerar el nivel en que puede afectar una restricción energética antes de la gestación (Matusiak, Barrett et al. 2014). Si bien parece que existen indicios de que una pérdida de peso en mujeres obesas antes de la concepción puede suponer beneficios tanto para la salud materna como para la de la descendencia, no existe un consenso en las estrategias que deben seguir las mujeres para esta pérdida de peso antes del embarazo. El principal problema estaría en que habría que evitar periodos de balance energético negativo durante las etapas iniciales de la gestación. Si bien es verdad, como hemos comentado hasta ahora, que la sobrealimentación y la obesidad materna durante la gestación puede tener consecuencias en la salud metabólica de la descendencia (Figura 1.2), una restricción calórica durante las etapas iniciales de la gestación también produce adaptaciones metabólicas que predisponen a la descendencia a un mayor desarrollo de obesidad (Garcia, Palou et al. 2010; Palou, Priego et al. 2010; Garcia, Palou et al. 2011; Konieczna, Garcia et al. 2013). Los estudios de la hambruna holandesa, son un ejemplo que apoya la tesis de que una desnutrición en edades tempranas de la vida produce un aumento de la obesidad en edad adulta (revisado en (Barker 1990; Martorell, Stein et al. 2001; Pico, Palou et al. 2012)). Durante los últimos 6 meses de la 2ª Guerra mundial el hambre asoló la parte occidental de Holanda, de forma que la ingesta de las mujeres embarazadas de esta zona se redujo de 1400 kcal a 800 Kcal por día. Cuando los hijos de estas mujeres se alistaron al ejército, a los 19 años, se observó una gran incidencia de casos de obesidad en las zonas expuestas al hambre comparadas con zonas del mismo país no expuestas. Existen además numerosos estudios en animales que muestran que una restricción calórica durante la gestación predispone a la descendencia a obesidad y complicaciones asociadas (revisado en (Pico, Palou et al. 2012))

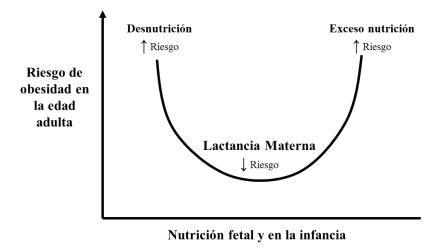


Figura 1.2. La nutrición en etapas tempranas y su relación con la predisposición al desarrollo de obesidad en la edad adulta. Adaptado de (Martorell, Stein et al. 2001)

Por tanto, son necesarios más estudios para determinar los efectos beneficiosos de la pérdida de peso materno antes de la gestación, evitando los riesgos asociados tanto a la obesidad materna como a la restricción calórica durante la gestación (Zhang, Rattanatray et al. 2011; Matusiak, Barrett et al. 2014).

1.3. Componentes bioactivos de la leche materna

Existen numerosas investigaciones basadas en los beneficios de la leche materna. La desnutrición ocasiona el 60% de los 10,9 millones de muertes que ocurren cada año en niños menores de 5 años. Más de dos terceras partes de estas muertes están asociadas con malos hábitos alimenticios que se realizan durante el primer año de vida. Los niños que logran sobrevivir a estas deficiencias nutricionales a menudo padecen enfermedades y complicaciones para un buen desarrollo. La lactancia materna es una etapa clave en los primero días de vida. No obstante las cifras de alimentación con leche materna siguen siendo bajas aún después de toda la evidencia científica existentes que demuestra un menor riesgo de mortalidad y desnutrición (Jones, Steketee et al. 2003; Debes, Kohli et al. 2013). Como recomendación general, los recién nacidos deben ser alimentados exclusivamente de leche materna durante los primeros 6 meses de vida para alcanzar un óptimo crecimiento y desarrollo (OMS 2003). A partir de los seis meses la lactancia materna debería continuar, combinada con otros alimentos de buena calidad nutritiva y en cantidades suficientes, como mínimo hasta los dos años de vida (Hornell, Lagstrom et al. 2013).

Los nutrientes en la leche humana tienen múltiples funciones, como proporcionar aminoácidos en cantidades suficientes para asegurar un buen funcionamiento del tejido muscular y facilitar un óptimo desarrollo de funciones fisiológicas importantes. Además de los nutrientes, la leche materna contiene una gran variedad de elementos entre los que se encuentran citoquinas, péptidos reguladores, enzimas, inmunoglobulinas, proteínas y esteroides para mantener las necesidades metabólicas de los recién nacidos. La lactancia materna tiene beneficios preventivos contra alteraciones metabólicas y enfermedades crónicas, además es considerado como alimento funcional debido a los múltiples beneficios en la nutrición (Hawkes, Bryan et al. 2004; Savino, Liguori et al. 2010). La leche materna proporciona menor cantidad de proteínas que la leche de fórmula (Arenz, Ruckerl et al. 2004). La alimentación con leche materna, frente a las leches de fórmula, proporciona una gran cantidad de ventajas como la mejora de funciones cognitivas, la disminución de la incidencia de enfermedades autoinmunes y la protección frente a estados de sobrepeso u obesidad en etapas adultas (Agostoni 2005)

Hasta hace poco se desconocían qué compuestos bioactivos son los responsables de esta acción protectora de la leche materna en la futura prevención de desarrollo de alteraciones metabólicas en la edad adulta. Se han identificado en la leche un número considerable de hormonas que intervienen en la regulación de la homeostasis energética entre las que se incluyen: leptina, adiponectina e insulina (Savino and Liguori 2008; Aydin, Kuloglu et al. 2013). Estas hormonas tiene la capacidad de regular la actividad de varios tejidos, hasta que el sistema endócrino del neonato inicia su funcionamiento (Savino and Liguori 2008). Algunos de éstos péptidos son secretados en su forma activa. La leptina, insulina y la adiponectina son ejemplos de estas sustancias bioactivas que tienen una función importante en la regulación de la ingesta energética y la composición corporal. Además de tener un efecto directo sobre el control del apetito y la ganancia de peso en el recién nacido, éstos péptidos también favorecen la maduración intestinal y el desarrollo de circuitos neuronales en el sistema nervioso central que controlan el metabolismo. En este sentido, las hormonas presentes en la leche materna

pueden influir metabólicamente durante los primeros años de vida de los hijos (Agostoni 2005). Por lo tanto el papel protector de la leche materna se puede atribuir no solo a su composición nutricional sino a la función de diferentes adipoquinas presentes (Karatas, Durmus Aydogdu et al. 2011). En particular, el descubrimiento de la nueva función de la leptina en la leche materna por nuestro laboratorio ha abierto una nueva puerta en este campo del conocimiento (Miralles, Sanchez et al. 2006; Pico, Oliver et al. 2007; Sanchez, Priego et al. 2008; Konieczna, Sanchez et al. 2015).

1.3.1. Leptina

En animales la suplementación con dosis fisiológicas de leptina durante la lactancia tiene un efecto preventivo del desarrollo de obesidad y sobrepeso en etapas adultas (Pico, Oliver et al. 2007; Sanchez, Priego et al. 2008) y sobre las características metabólicas propias del síndrome metabólico: los animales suplementados con leptina oral durante la lactancia presenta, en la edad adulta, una mayor sensibilidad a la insulina y a la leptina y una menor preferencia por los alimentos ricos en grasas (Sanchez, Priego et al. 2008).

La leptina es una hormona no glicosilada de 16 kDa que pertenece a la clase 1 de una familia de citoquinas (Abella, Scotece et al. 2014). Ejerce su acción biológica a través de la activación de su receptor Ob-Rb. En principio, su principal función es el de mantener la homeostasis energética en el organismo. La leptina actúa a nivel hipotalámico como señalizadora del estatus nutricional, por lo que se la considera una importante señal reguladora del peso corporal y del balance energético (Ahima 2006). Se ha descrito que reduce la ingesta de alimentos y aumenta el gasto energético al actuar específicamente sobre el núcleo hipotalámico activando factores anorexigénicos y suprimiendo la acción de neuropéptidos orexigénicos (Ahima, Prabakaran et al. 1996). Además, disminuye la cantidad de energía almacenada e incrementa su movilización a nivel periférico ayudando en el mantenimiento del balance energético (Brunton and Russell 2008). De hecho, la supresión del gen de leptina o de su receptor provoca un apetito postprandial constante que genera un consumo excesivo de alimentos y por lo tanto un desequilibrio en el balance energético (Bochukova, Huang et al. 2010).

La leptina, está principalmente producida por los adipocitos y sus niveles circulantes están positivamente correlacionados con el tamaño de las reservas grasas y el índice de masa corporal (IMC) (Maffei, Halaas et al. 1995; Ostlund, Yang et al. 1996). Además, su síntesis también está regulada por mediadores inflamatorios (Gualillo, Eiras et al. 2000). Tanto en ratones como en humanos, se observa un descenso de la leptinemia tras la pérdida de peso corporal (Maffei, Halaas et al. 1995). Como ya ha sido descrito antes, hay un incremento de los niveles de leptina circulantes en condiciones de obesidad (Hamed, Zakary et al. 2011), aunque hay niveles elevados, existe una pérdida en la capacidad de señalización para la saciedad lo que puede ocurrir como resultado de una resistencia a la leptina (Brabant, Nave et al. 2002). Si bien el tejido adiposo es la principal fuente de leptina circulante, también el estómago produce y libera leptina, tanto al lumen gástrico como a la circulación, en cantidades sustanciales y regulables por la ingesta, lo que plantea un aspecto novedoso en la función de la leptina como mediador en la respuesta saciante a corto plazo (Cinti, de Matteis et al. 2001; Oliver, Pico et al. 2002; Pico, Oliver et al. 2003; Sanchez, Oliver et al. 2004).

Leptina en leche

La leptina está también presente en la leche materna (Casabiell, Pineiro et al. 1997; Houseknecht, McGuire et al. 1997) y es absorbida por el estómago imaduro de ratas

neonatas y trasferida a la circulación (Casabiell, Pineiro et al. 1997; Oliver, Pico et al. 2002; Sanchez, Oliver et al. 2005). De hecho, se han identificado receptores de leptina en el epitelio gástrico y en células de absorción del intestino (Barrenetxe, Villaro et al. 2002), lo cual sugiere que la leptina puede pasar desde la leche materna a la circulación sanguínea del lactante y ejercer su función de regulación de la ingesta a corto plazo en el neonato. En animales se ha observado que los niveles de absorción estomacal de leptina son elevados, particularmente durante la primera mitad de la lactancia cuando la producción propia de leptina en el estómago aún se encuentra baja (Oliver, Pico et al. 2002). En la segunda mitad del periodo de lactancia, coincidiendo en ratas con el inicio de la alimentación con dieta sólida, dicha absorción exógena de leptina va disminuyendo (Oliver, Pico et al. 2002). En ratas lactantes, la suplementación con leptina, ya sea directamente en la leche o disuelta simplemente en agua, puede ser absorbida por el estómago aún en fase de maduración y (Casabiell, Pineiro et al. 1997; Oliver, Pico et al. 2002; Sanchez, Oliver et al. 2005) ser transferida directamente a la sangre (Casabiell, Pineiro et al. 1997; Sanchez, Oliver et al. 2005). La leptina suplementada por vía oral en ratas también regula la ingesta energética, inhibiendo el consumo de alimentos (Sanchez, Oliver et al. 2005).

La producción de leche se lleva a cabo en tres fases: el calostro que es la leche inicial producida después del parto en los primeros 5 días de vida, la leche transicional que es producida desde el día 6 al día 15 después del parto y finalmente la leche madura que es producida 15 días después del parto (Sala-Vila, Castellote et al. 2005). Se ha visto que la concentración de leptina en la leche materna es más alta en la fase de calostro (Bonnet, Delavaud et al. 2002), después inicia una reducción durante los primeros 180 días. Los niveles de leptina en leche humana son variables entre la población, existe una correlación positiva entre las concentraciones del leptina en leche y las concentraciones en plasma y la adiposidad (Houseknecht, McGuire et al. 1997; Uysal, Onal et al. 2002).

El hecho de que la leptina esté presente de manera natural en la leche materna, no así en las fórmulas infantiles (O'Connor, Funanage et al. 2003), y sabiendo que en comparación con la leche de fórmula, la leche materna ejerce un efecto protector frente a la obesidad en etapas adultas (Armstrong, Reilly et al. 2002), podría sugerir un papel de la leptina como un componente de la leche materna y la prevención del sobrepeso u obesidad en etapas tardías. Existen también evidencias en humanos del papel de la leptina, como un componente de la leche materna en la futura prevención del desarrollo de obesidad en la edad adulta. Los niveles de leptina en leche se correlacionan negativamente con el incremento de índice de masa corporal de los neonatos durante el primer mes de vida (Doneray, Orbak et al. 2009) y con el incremento de peso corporal hasta los 6 meses (Schuster, Hechler et al. 2011) e incluso con la ganancia de peso corporal hasta los 2 años de edad (Miralles, Sanchez et al. 2006).

Por tanto, resulta interesante identificar a aquellos factores, por ejemplo factores nutricionales maternos, que puedan afecten a la cantidad de leptina en la leche materna, como estrategia para la prevención de la obesidad en la edad adulta.

1.3.2. Adiponectina

La adiponectina es una proteína, también conocida como Acrp30 (*adipocyte complement-related protein* de 30 kDa), secretada por los adipocitos (Scherer, Williams et al. 1995), cuya expresión incrementa durante la diferenciación de preadipocito a adipocito maduro (Beltowski 2003) y su secreción es estimulada por la insulina (Meier and Gressner 2004).

Su síntesis está regulada por PPARγ (receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma, *peroxisomal proliferator-activated receptor-*γ), un receptor nuclear cuya expresión en hígado y músculo es importante para la regulación de la resistencia a la insulina en obesidad (Maeda, Takahashi et al. 2001). La adiponectina tiene dos receptores: Adipo-R1 cuya expresión es abundante en músculo esquelético mientras que Adipo-R2 es abundante en hígado. Al interrumpir la actividad de los dos receptores se produce una reducción en la expresión de PPARγ, en la oxidación de ácidos grasos y la captación de glucosa (Yamauchi, Kamon et al. 2003).

Entre sus funciones está la de regular los niveles de glucosa y la degradación de ácidos grasos (Maeda, Okubo et al. 1996). Participa también en la regulación de la homeostasis energética estimulando la ingesta de alimentos y reduciendo el gasto de energía (Schondorf, Maiworm et al. 2005; Kubota, Yano et al. 2007).

Es la más abundante de las adipoquinas con una concentración en suero de 5-30 μg/mL (Min, Lemon et al. 2012). Se encuentra en bajas concentraciones en individuos con obesidad (Gavrila, Chan et al. 2003; Hoffstedt, Arvidsson et al. 2004) y en individuos con resistencia a la insulina (Hu, Liang et al. 1996; Hotta, Funahashi et al. 2000; Weyer, Funahashi et al. 2001). Los niveles de adiponectina aumentan con la mejora de la sensibilidad a la insulina y con la pérdida de peso (Yang, Lee et al. 2001; Hulver, Zheng et al. 2002; Milan, Granzotto et al. 2002).

Adiponectina en leche

En el 2006 se describió por primera vez la presencia de adiponectina inmunoreactiva en leche humana (Bronsky, Karpisek et al. 2006; Martin, Woo et al. 2006). La presencia de adiponectina en leche materna, la expresión de Adipo-R1 en intestino de ratones lactantes (Zhou, Sun et al. 2005) y la expresión de Adipo-R1 y Adipo-R2 en el epitelio de colon humano (Yoneda, Tomimoto et al. 2008), sugiere que esta adipoquina podría participar en la regulación del crecimiento y desarrollo del neonato (Savino and Liguori 2008).

La concentración media de adiponectina en leche es de aproximadamente 19 ng/mL (rango 4,2 a 87,9 ng/mL) lo que representa 40 veces más que las cantidades descritas para leptina (Bronsky, Karpisek et al. 2006; Martin, Woo et al. 2006). En humanos, la concentración de adiponectina en leche disminuye durante la lactancia (Martin, Woo et al. 2006; Weyermann, Brenner et al. 2007), aunque parecen existir resultados opuestos, indicando que los niveles de adiponectina en leche aumentan a medida que avanza el periodo de lactancia, y que, además, estos niveles se ven afectados por el estado hormonal e inflamatorio de la madre (Ozarda, Gunes et al. 2012).

Los niveles de adiponectina en leche se asocian positivamente con la adiposidad materna (Martin, Woo et al. 2006; Wang, Zhang et al. 2011). Estudios en humanos indican que niveles elevados de adiponectina en leche se asocian en niños con un mayor peso corporal, incremento de peso o adiposidad, sugiriendo que puede ser un factor de riesgo para el sobrepeso en la infancia (Weyermann, Brenner et al. 2007; Cesur, Ozguner et al. 2012; Woo, Guerrero et al. 2012)

1.3.3. Irisina

La actividad física ayuda a mantener un estilo de vida saludable y, cuando se combina con una dieta balanceada y de buena calidad, facilita la prevención de diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares. Además favorece el incremento en el organismo de citoquinas que contribuyen a la comunicación tisular, factor vital para el mantenimiento

de la homeostasis energética (Pedersen 2011). En este sentido, el músculo esquelético se ha definido como un órgano endócrino que libera una cantidad de citoquinas, llamadas mioquinas que regulan una gran cantidad de funciones fisiológicas y vías metabólicas (Pedersen 2011), como por ejemplo la Irisina.

La irisina es una proteína de 12,587 kDa constituida por 112 aminoácidos, codificada por el gen FNDC5 (*Fibronectin type III domain-containing protein 5*), identificada en el 2012 cuya expresión esta inducida por PPARγ y por PGC1α (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha*) (Bostrom, Wu et al. 2012).

Se ha descrito que el ejercicio activa la secreción de Irisina, incrementando de este modo el gasto energético y la termogénesis (Bostrom, Wu et al. 2012). Algunos estudios han demostrado altos niveles de irisina en plasma después del ejercicio (Bostrom, Wu et al. 2012; Huh, Panagiotou et al. 2012). Algunos factores metabólicos como la glucosa o los ácidos grasos podrían intervenir también en su regulación (Kurdiova, Balaz et al. 2014).

Por otro lado, existen resultados que sugieren que la irisina puede provocar una reducción en los niveles de glucosa, insulina y triglicéridos después de una intervención nutricional de 8 semanas en sujetos con obesidad y con síntomas de síndrome metabólico. De hecho, existe una correlación positiva entre los niveles de irisina al inicio de la intervención alimentaria y la reducción de la concentración de glucosa y de insulina, así como del índice HOMA, independientemente de la pérdida de peso (Lopez-Legarrea, de la Iglesia et al. 2014). Además, niveles más elevados de irisina la inicio de la intervención se relacionan con mejores efectos beneficiosos en relación con la reducción en la concentración de triglicéridos (Lopez-Legarrea, de la Iglesia et al. 2014). Por lo tanto, el efecto de la irisina sobre la concentración de glucosa se ve reflejado también en los niveles de triglicéridos. Estos resultados sugerirían que la irisina podría ser considerado un regulador fisiológico que disminuye las alteraciones metabólicas relacionadas con el sobrepeso y obesidad (Lopez-Legarrea, de la Iglesia et al. 2014).

La irisina también es producida por los adipocitos, sin embargo en menores cantidades (Roca-Rivada, Castelao et al. 2013). Algunos estudios han demostrado que la irisina tiene la capacidad de inducir marronización (proceso que consiste en la aparición de adipocitos similares a los adipocitos marrones en depósitos del tejido adiposo blanco) (Bonet, Oliver et al. 2013; Giralt and Villarroya 2013) en los adipocitos blancos de ratones. El tejido adiposo marrón se encuentra en pequeñas cantidades en adultos, si bien en recién nacidos y niños mayores las cantidades son más elevadas (Tanuma, Tamamoto et al. 1975). Si estos resultados pudieran ser comprobados en tejido humano, la irisina podría ser considerada como un buen agente terapéutico en la prevención o tratamiento de la obesidad (Irving, Still et al. 2014) ya que la estimulación del tejido adiposo en humanos se ha propuesto como una posible alternativa en la prevención de la obesidad y sus posibles complicaciones metabólicas (Wu, Bostrom et al. 2012).

Irisina en leche

Hasta la fecha, la presencia de irisina en leche materna se ha descrito en humanos en un solo estudio (Aydin, Kuloglu et al. 2013) y no hay, de momento, estudios de niveles de irisina en leche de rata. Según el estudio de Aydin et al, la concentración de irisina en la leche (tanto en calostro como en leche transicional y leche madura) es menor en mujeres lactantes con diabetes mellitus gestacional que en la leche de mujeres lactantes sanas (Aydin, Kuloglu et al. 2013). Además, los niveles de irisina son mayores en el calostro que en la leche transicional y que en la leche madura (Aydin, Kuloglu et al. 2013).

1.4. Homeostasis energética y metabolismo lipídico

El balance o el equilibrio energético es una condición esencial para el mantenimiento de la vida (Solinas, Boren et al. 2015). La situación de balance energético se alcanza cuando el gasto de energía es igual al consumo. Los mecanismos encargados de mantener el balance energético en el organismo aún se siguen estudiando, sin embargo las investigaciones han avanzado y descrito que existe un control fisiológico involucrado en la regulación metabólica. Este sistema incluye diferentes señalizaciones periféricas que se activan en función de las reservas energéticas y que en consecuencia controlan el consumo y gasto de energía (Sandoval, Cota et al. 2008).

El balance de energía positivo (cuando la ingesta excede al gasto) resulta en un almacenamiento energético generando una ganancia de peso corporal, mientras que el balance de energía negativo (cuando la ingesta es menor que el gasto) produce la movilización de las reservas energéticas así como la pérdida de peso corporal (Leibel, Rosenbaum et al. 1995). Por lo tanto, la obesidad es el resultado de un mal balance entre la ingesta y el gasto energético, donde el exceso de energía es almacenada en el tejido adiposo en forma de triglicéridos.

El metabolismo energético en los seres vivos está regulado para mantener el equilibrio. Cambios en la ingesta de alimentos, el ayuno o en los patrones de alimentación, generan factores de defensa contra estas situaciones adversas para mantener una homeostasis energética (Goodman, Larsen et al. 1980; Palou, Remesar et al. 1981).

De forma cuantitativa, la principal forma de almacenamiento de energía en el organismo son los lípidos en el tejido adiposo. Estas reservas energéticas provienen o bien de los triglicéridos de la dieta o bien de la síntesis de novo por sustratos no lipídicos (glucosa principalmente). La lipogénesis de novo tiene lugar, principalmente en el hígado y en el tejido adiposo. Es un proceso que está regulado por las condiciones nutricionales. El SREBP1c (factor de transcripción de unión al elemento regulador de esteroles 1, sterol regulatory element binding protein 1c) es el principal factor implicado en la regulación nutricional de la lipogénesis (Gosmain, Dif et al. 2005). SREBP1c es considerado un importante mediador de la acción de la insulina sobre las enzimas lipogénicas, tales como la ácido graso sintasa (FAS, fatty acid synthase), la acetil-coenzima A carboxilasa (ACC), estearoil-CoA desaturasa-1 (SCD1), glicerol-3-fosfato-1-aciltransferasa (GPAT) y la hexoquinasa II (HKII). Durante una ingesta de alimentos se utilizan los carbohidratos como primera fuente energética para generar ATP, sin embargo, si el consumo sigue siendo elevado, el exceso de carbohidratos es convertido en ácidos grasos para ser almacenados en forma de triglicéridos en el tejido adiposo (Palou, Priego et al. 2008). En ausencia de una ingesta energética los niveles de glucosa en sangre se encuentran en bajas cantidades, el organismo utiliza casi exclusivamente la grasa como fuente energética, en este sentido los triglicéridos almacenados en el tejido adiposo son hidrolizados (lipolisis), en ácidos grasos no esterificados (NEFA), los cuales son liberados en el plasma para transportarse al hígado y generar energía (Seitz, Muller et al. 1977; Hashimoto, Cook et al. 2000). Los triglicéridos son hidrolizados principalmente por la acción de la lipasa adiposa de triglicéridos (ATGL, adipose triglyceride lipase), que está implicada en el primer paso de la movilización de los triglicéridos y rinde una molécula de NEFA y un diacilglicerol (DAG) (Young and Zechner 2013). Los DAG son nuevamente hidrolizados por la lipasa sensible a hormonas (HSL, hormone-sensitive lipase), liberando una molécula de NEFA v monoacilglicerol (MAG). Posteriormente el MAG es completamente hidrolizado por la lipasa de MAG para generar una molécula de glicerol y un NEFA (Young and Zechner

2013). La lipolisis está fuertemente regulada por señales hormonales y nutricionales, de forma que se activa en situaciones de demanda energética. Su correcta activación o inhibición es crucial para el mantenimiento de la salud. Una incorrecta inhibición de la lipolisis cuando las demandas de ácidos grasos son bajas, puede tener consecuencias metabólicas graves, y de hecho se cree que es el mecanismo molecular subyacente en el desarrollo de la diabetes de tipo 2 en la obesidad (Nielsen, Jessen et al. 2014). La lipolisis es excepcionalmente sensible a la insulina. La insulina inhibe lipolisis en el tejido adiposo al inhibir la acción de la HSL (Carmen and Victor 2006). De esta forma la insulina genera un efecto metabólico antilipolítico, en el cuál se da preferencia a la oxidación de los carbohidratos para la producción de energía en lugar de los ácidos grasos.

1.4.1. Control central de la ingesta

Tanto la ingesta de alimentos como el gasto energético están regulados principalmente por el sistema nervioso central (SNC). La adquisición y consumo de alimentos es un comportamiento universal entre las especies para la supervivencia y la reproducción, donde una gran cantidad de circuitos neuronales se han desarrollado a lo largo del tiempo para el control de la conducta alimentaria. Las señales inductoras de la ingesta de alimentos son detectadas por múltiples órganos sensoriales y son transmitidas al sistema límbico del cerebro. Este sistema procesa información acerca de la palatabilidad de los alimentos, la percepción de los sabores y el gusto por aquellos alimentos apetecibles (Berthoud 2011; Berthoud 2012). El valor hedónico y las características organolépticas de los alimentos son propiedades que conducirán a desarrollar un conjunto de actividades anticipatorias relacionadas con la ingesta alimenticia. Durante el periodo de ingesta tanto el olor, el sabor y la textura de los alimentos producen señales que son transmitidas al área cognitiva y emocional del cerebro para mantener la conducta alimentaria en estado activo (Rui 2013).

Otra área del cerebro, el hipotálamo recibe señales de saciedad para regular la ingesta y el gasto energético. Estas señales incluyen la información necesaria para detectar la cantidad disponible y almacenada de energía en el organismo. Por lo tanto el hipotálamo funcionaría como una estructura neural que puede controlar la homeostasis energética a largo plazo y en efecto el peso corporal del individuo. De acuerdo a la estructura anatómica del hipotálamo se encuentran sitios muy definidos como el núcleo arqueado (ARC), zona ventromedial (VMH), dorsomedial (DMH), lateral (LH) y paraventricular (PVH). Estos núcleos están relacionados con la regulación homeostática del apetito, la ingesta y el peso corporal (Rui 2013).

En la regulación central de la homeostasis energética juegan un papel muy importante la leptina y la insulina. Después de la clonación del gen ob que codifica para la leptina en diciembre de 1994 (Zhang, Proenca et al. 1994), se describieron una serie de mecanismos que participan en la regulación de la ingesta, el gasto de energía y las reservas de grasa. El núcleo ARC del hipotálamo se considera una región importante en la transducción de señales de adiposidad a través de respuestas neuronales (Schwartz, Woods et al. 2000). Dos neuropéptidos importantes en la regulación de la ingesta están presentes en el núcleo ARC, el neuropéptido Y (NPY) con efectos orexigénicos y la proopiomelanocortina (POMC) con funciones anorexigénicas (Elias, Lee et al. 1998). Los dos neuropéptidos están regulados por la acción de la leptina e insulina pero de forma opuesta, es decir cuando los niveles de insulina o de leptina disminuyen se produce una activación neuronal del NPY (Sipols, Baskin et al. 1995; Stephens,

Basinski et al. 1995; Schwartz, Baskin et al. 1996; Broberger, Johansen et al. 1998; Hahn, Breininger et al. 1998) y se inhibe la función de POMC (Schwartz, Seeley et al. 1997; Thornton, Cheung et al. 1997; Elias, Lee et al. 1998; Kristensen, Judge et al. 1998). Las neuronas que expresan POMC en el núcleo ARC del hipotálamo son activadas por la leptina, siendo por lo tanto una señal que une las reservas energéticas con la actividad de POMC en el hipotálamo. En situaciones donde existe un exceso de energía, altos niveles de leptina activan las neuronas que expresan POMC y se desencadena la liberación de melanocortinas lo que suprime la ingesta de alimentos e incrementa el gasto energético, de manera simultánea la leptina suprime la actividad de NPY en el núcleo ARC (Coll 2007).

OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

2. Objetivos y Planteamiento Experimental

La prevalencia de obesidad y sobrepeso en la infancia ha aumentado drásticamente en los últimos años, así como sus riesgos asociados como la diabetes de tipo II y la enfermedad cardiovascular, convirtiéndose en un grave problema de salud pública (Lobstein, Baur et al. 2004; Ahrens, Bammann et al. 2006). Este aumento de sobrepeso y obesidad infantil es probablemente debido a cambios en factores ambientales y sociales. La obesidad se ve favorecida por las actuales condiciones ambientales obesogénicas como pueden ser la ingesta de alimentos ricos en energía y un mayor tamaño de las porciones así como una menor actividad física (Kral and Rolls 2004; McConahy, Smiciklas-Wright et al. 2004; Hebestreit, Bornhorst et al. 2014).

Así mismo, también ha aumentado la incidencia de la obesidad en mujeres en edad fértil, lo que puede conllevar, no solo determinadas complicaciones durante el embarazo sino también trastornos en la salud de la descendencia, tanto a corto como a largo plazo. Se ha descrito que existe un mayor riesgo de desarrollar obesidad y síndrome metabólico en descendientes de madres obesas (Jacobs, Teixeira et al. 2014). De esta manera, la exposición temprana a un exceso de grasa, especialmente durante la vida fetal y postnatal temprana, períodos especialmente vulnerables a factores externos, puede tener efectos negativos sobre la salud metabólica de la descendencia. De hecho, numerosos estudios epidemiológicos en humanos y estudios en animales han mostrado que la nutrición perinatal afecta la susceptibilidad a enfermedades crónicas relacionadas con la dieta en la edad adulta, incluyendo la obesidad y otras alteraciones asociadas (Langley-Evans 1999). Es lo que se conoce como "programación metabólica", y es la base de la teoría de los orígenes de enfermedades o alteraciones en la edad adulta, de forma que alteraciones en la nutrición en etapas críticas del desarrollo pueden causar adaptaciones que predispongan al individuo al desarrollo de enfermedades metabólicas, endocrinas y cardiovasculares y, en particular a la obesidad (Barker, Eriksson et al. 2002). En particular, se tiene la idea de que tanto la desnutrición como la sobrealimentación durante el embarazo tienen efectos potencialmente adversos sobre la adiposidad de los hijos en la edad adulta (Martorell, Stein et al. 2001).

La hipótesis de partida es que la ingesta de una dieta de cafetería en etapas tempranas puede afectar a la respuesta metabólica a las condiciones de alimentación y ayuno; sin embargo, la reversión desde una dieta de cafetería en ratas obesas a una dieta estándar, un mes antes de la gestación, puede prevenir los efectos perjudiciales de la obesidad materna en las crías. Por tanto, el objetivo de esta tesis ha sido estudiar el efecto de determinadas condiciones nutricionales (exceso de grasa asociado a la alimentación obesogénica) sobre la programación metabólica tanto en etapas perinatales como en etapas tempranas. Por una parte, nos interesó estudiar en ratas los efectos a corto plazo de una dieta obesogénica durante etapas tempranas. Por otro lado, quisimos determinar qué efecto produce en la descendencia la reversión de la dieta de cafetería antes de la gestación, en un modelo de ratas de obesidad dietética

Para ello nos planteamos dos objetivos particulares:

Objetivo 1. Analizar los efectos de una corta exposición a una dieta obesogénica (dieta de cafetería) durante etapas tempranas en relación a su respuesta metabólica bajo condiciones de ayuno y alimentación en tejidos clave implicados en la homeostasis energética.

<u>Objetivo 2</u>. Analizar si la reversión de la dieta obesogénica antes del embarazo en ratas hembra obesas debido a la ingesta de una dieta de cafetería (modelo postcafetería) puede prevenir los efectos deletéreos de la obesidad materna en la descendencia.

En los estudios de la presente tesis doctoral, se ha utilizado principalmente la dieta de cafetería como dieta de engorde. La exposición a una dieta de cafetería en ratas induce una hiperfagia persistente y el aumento de la ingesta de energía como resultado de la variedad, palatabilidad y la novedad de los alimentos disponibles, de manera similar a los hábitos alimentarios y costumbres poco saludables observados en humanos (Pico, Pons et al. 1991; Akyol, McMullen et al. 2012; Oliver, Reynes et al. 2013). Estos modelos han sido extensamente utilizados en nuestro grupo de investigación, y resultados previos muestran que la dieta de cafetería administrada durante los primeros meses de vida y en la edad adulta conduce a un importante y persistente aumento del peso corporal, asociado a una excesiva acumulación de grasa corporal y alteraciones metabólicas, que no son completamente revertidas cuando los animales se les cambia a una dieta control (modelo post-cafetería) (Llado, Proenza et al. 1991; Proenza, Llado et al. 1992; Matamala, Gianotti et al. 1996; Akyol, McMullen et al. 2012). Por tanto, los modelos animales cafetería y postcafetería proporcionan una herramienta útil para el estudio del síndrome metabólico en los seres humanos.

El trabajo experimental de esta tesis doctoral se ha llevado a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular, Nutrición y Biotecnología, dirigido por el Profesor Andreu Palou, de la Universidad de las Islas Baleares y CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN). El presente proyecto de tesis doctoral, ha sido posible gracias a una beca del Programa de mejoramiento del Profesorado (PROMEP) de la Subsecretaría de Educación Superior de Méjico. Este proyecto forma parte de un proyecto de investigación, subprograma de proyectos de investigación fundamental no orientada, financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad cuyo título es "Detección y caracterización de compuestos bioactivos en la leche. Un enfoque nutriepigenético contra la obesidad (EPIMILK)"- AGL2012-33692.

Objetivo 1. Analizar los efectos de una corta exposición a una dieta obesogénica (dieta de cafetería) durante etapas tempranas en relación a su respuesta metabólica bajo condiciones de ayuno y alimentación en tejidos clave implicados en la homeostasis energética.

Ante la creciente tasa de obesidad en etapas infantiles a nivel mundial, se hace más evidente la necesidad de elaborar estrategias de prevención y/o tratamiento, con el objetivo de evitar el desarrollo de enfermedades en etapas adultas. Desde un punto de vista nutricional la prevención es un factor clave para regular la salud. La obesidad infantil puede ser considerada como una llamada de atención ya que este problema puede mantenerse a lo largo de la vida (Whitaker, Wright et al. 1997). Los hábitos y costumbres alimenticias están en cambio constante, generando mayor sedentarismo y menor frecuencia de actividades físicas en niños de edad escolar.

En estado de obesidad, existen alteraciones metabólicas que pueden cambiar la capacidad del organismo para responder frente a diferentes situaciones de estrés. Es de particular interés el mantenimiento de la homeostasis energética en los ciclos de ayuno/alimentación, que caracterizan a los hábitos alimenticios de los mamíferos. La respuesta metabólica a estas situaciones implica adaptaciones hormonales y metabólicas que además son acompañadas por cambios en la expresión genética en procesos claves del metabolismo (Palou, Remesar et al. 1981; Palou, Priego et al. 2008; Sanchez, Palou et al. 2009).

Se ha descrito que ratas adultas obesas alimentadas con una dieta de cafetería presentan alteraciones en la regulación nutricional ya que las adaptaciones metabólicas a los cambios agudos en las condiciones de alimentación están alteradas (Llado, Pons et al. 1999; Caimari, Oliver et al. 2007; Caimari, Oliver et al. 2010). Aunque existen numerosos estudios de los efectos de la ingesta dieta de cafetería a largo plazo, se conoce poco sobre los efectos más a corto plazo de la ingesta de esta dieta obesogénica durante etapas infantiles/juveniles. Por tanto, el primer objetivo de esta tesis doctoral, fue evaluar el efecto de un período corto de exposición a la dieta de cafetería en ratas jóvenes sobre la capacidad de responder a cambios agudos en las condiciones de alimentación (ayuno/alimentación) en tejidos claves del metabolismo como el hígado, tejido adiposo blanco e hipotálamo, así como el impacto que puede tener esta dieta en la homeostasis energética.

Para ello, crías macho de ratas Wistar fueron alimentadas con dieta de cafetería o con dieta control, desde el día 10 de vida, edad aproximada en la que ocurre la transición natural de la dependencia de leche materna al consumo de alimentos sólidos (Oliver, Pico et al. 2002), hasta el día 21. Los machos fueron destetados a día 21 y continuaron con la dieta control o la dieta de cafetería hasta día 22 cuando fueron sacrificados bajo condiciones de ayuno o alimentación ad libitum (Figura 2.1). Antes del sacrificio de los animales se determinó la composición corporal mediante EchoMRI y la ingesta de las últimas 12 horas en los animales sacrificados en condiciones de alimentación ad libitum. Tras el sacrificio, se recogieron muestras de sangre para la obtención de plasma y muestra de tejido adiposo blanco retroperitoneal, hipotálamo e hígado para el estudio de la expresión génica de genes clave en el metabolismo y control del balance energético. Se determinaron diferentes parámetros plasmáticos como glucosa, leptina, insulina, triglicéridos y ácidos grasos libres. Además, en el hígado se analizaron por western blot los niveles de proteína del receptor de insulina (InsR) y de AKT (dos proteínas corriente abajo de la cascada de la señalización de la insulina) y los niveles de AMPK y la forma activa fosforilada de la AMPK (pAMPK) dado su papel central en la regulación del metabolismo celular, como sensor del estado energético. Los resultados obtenidos se presentan el en capítulo 1.

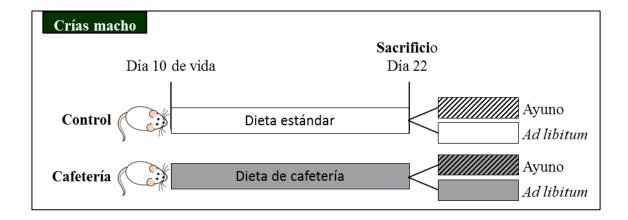


Figura 2.1. Esquema del diseño experimental del objetivo 1

Objetivo 2. Analizar si la reversión de la dieta obesogénica antes del embarazo en ratas hembra obesas debido a la ingesta de una dieta de cafetería (modelo postcafetería) puede prevenir los efectos deletéreos de la obesidad materna en la descendencia.

La obesidad materna durante el embarazo y la lactancia predispone a la obesidad y otros trastornos metabólicos en la descendencia en la edad adulta. Existe una gran cantidad de recomendaciones nutricionales para disminuir la incidencia de riesgos durante el embarazo, entre las que se encuentran realizar ejercicio y modificar la calidad y cantidad de los alimentos que se consumen, todo esto con la finalidad de reducir el peso corporal antes del embarazo. Si bien, parece ser que no existe un consenso unánime en las recomendación de cómo y cuándo perder peso antes del embarazo (Matusiak, Barrett et al. 2014). Referente a esto, quisimos ver cuál es el efecto en ratas que se produce al quitar una dieta obesogénica y cambiarla por una dieta estándar (modelo postcafetería), tratando de imitar lo que sería una restricción o régimen calórico antes del embarazo. En la presente tesis nos hemos planteado si los efectos perjudiciales esperados en la descendencia asociado a la obesidad dietética materna pueden ser revertidos con la eliminación de la dieta obesogénica antes de la gestación.

Para ello estructuramos nuestro estudio en diferentes tareas que se detallan a continuación:

Tarea 2.1. Desarrollar un modelo de obesidad inducida por dieta de cafetería (modelo postcafetería)

Para obtener el modelo de ratas postcafetería (Figura 2.2), trabajamos con ratas Wistar hembra, las cuales fueron alimentadas con una dieta de cafetería (además de tener libre acceso al pienso estándar) desde el día 10 hasta el día 100 de vida y a partir de entonces sólo con pienso estándar. Paralelamente se siguieron hembras de la misma edad alimentadas con dieta control.

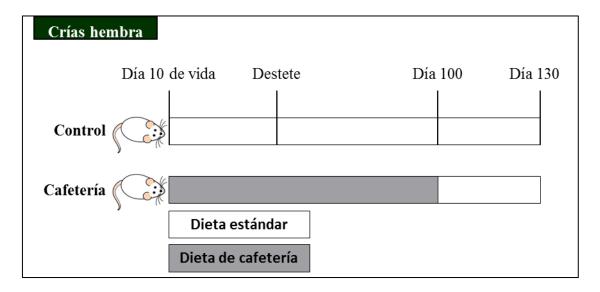


Figura 2.2. Esquema del diseño experimental para la obtención del modelo postcafetería.

Tarea 2.2. Analizar los efectos de la reversión de la dieta obesogénica antes del apareamiento en ratas hembra que presentan obesidad inducida por la dieta de cafetería (modelo postcafetería), en la composición de la leche materna, en particular en péptidos

bioactivos relacionados con la regulación del balance energético y determinar el efecto sobre el peso y composición corporal en la descendencia.

Un mes después de la retirada de la dieta de cafetería (tarea 2.1) las ratas hembra del grupo control y postcafetería fueron apareadas con machos controles (día 130). Durante este proceso se registró el peso corporal y la masa grasa tanto del grupo control como del grupo postcafetería. Tras el apareamiento 10 hembras del grupo control y 12 del grupo postcafetería se quedaron embarazadas y tuvieron al menos 10 crías por camada. Se controló la evolución del peso corporal, tanto de madres como crías durante todo el periodo de lactancia. A día 5, 10 y 15 de lactancia, se obtuvieron muestras de leche y sangre, para analizar los niveles de leptina, adiponectina e irisina y, se midió la composición de grasa corporal en las madres. Las crías de madres control y madres postcafetería fueron destetadas a día 21 de vida y estabuladas con dieta control hasta los 4 meses. Se siguió semanalmente el peso corporal y se determinó la composición de grasa corporal en el destete y a los 4 meses tanto de las crías macho como de las hembra. Se extrajeron muestras de sangre a los 4 meses, en condiciones de alimentación ad libitum y ayuno de 12h para el análisis de parámetros plasmáticos. En la figura 2.3 se representa esquemáticamente el diseño experimental de esta tarea.

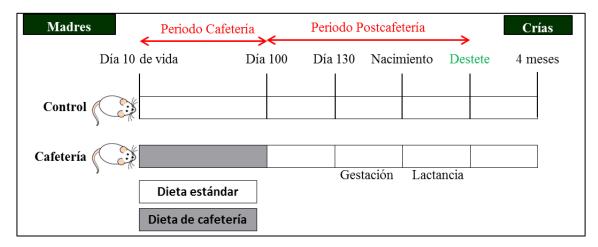


Figura 2.3. Esquema del diseño experimental de la tarea 2.2.

Los resultados obtenidos en las tareas 2.1 y 2.2 se presentan en el capítulo 2.

Tarea 2.3. Analizar si la reversión de la dieta obesogénica antes del apareamiento en ratas hembra que presentan obesidad inducida por la dieta de cafetería (modelo postcafetería), puede evitar los efectos perjudiciales de la obesidad materna en la descendencia sobre la expresión de genes relacionados con la homeostasis energética en tejidos claves y sus adaptaciones metabólicas a condiciones de alimentación/ayuno. Efecto en edades tempranas.

En esta tarea pretendimos profundizar en los efectos de la reversión de la dieta obesogénica 1 mes antes del apareamiento en madres que presentan obesidad inducida por la dieta (modelo postcafetería, tarea 2.1) más allá de los efectos fenotípicos (peso y grasa corporal). Para ello estudiamos los efectos en edades tempranas de la descendencia de madres del grupo control y postcafetería, en la expresión de genes relacionados con la homeostasis energética en tejidos claves y su respuesta a una situación de ayuno. Sacrificamos a los 26 días de edad crías (machos y hembras) de madres control y madres postcafetería bajo condiciones de ayuno (12h) o alimentación ad libitum. Se analizaron en el hígado genes relacionados con el metabolismo lipídico:

la captación de ácidos grasos (Cd36), lipogénesis (Srebf1, Fasn, Scd1), oxidación de ácidos grasos (Ppara, Cpt1a y Pdk4), metabolismo de la glucosa (Gck) y señalización de la insulina y la leptina (Lepr, Insr, Socs, Irs1). También fueron analizados genes expresados en tejido adiposo retroperitoneal implicados en la captación de ácidos grasos (Cd36, Lpl) y glucosa (Scl24a, Hk2), lipogénesis (Pparg, Srebp1c y Fasn), Cidea, lipolisis (Pnpla2), oxidación de ácidos grasos (Cpt1b) y señalización de la insulina y la leptina (Lepr, Insr). Además se analizó la expresión hipotalámicas de Ghsr, Lepr, Socs3, Stat3, Npy, Pomc. Se determinaron diferentes parámetros plasmáticos como glucosa, leptina y ácidos grasos libres.

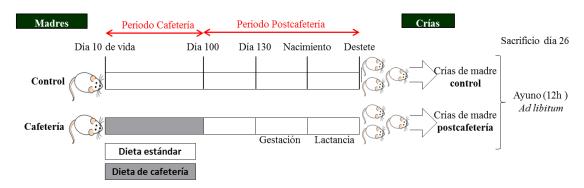


Figura 2.4. Esquema del diseño experimental de la tarea 2.3.

Los resultados obtenidos en esta tarea se presentan en el capítulo 3.

Tarea 2.4. Estudiar el efecto de la reversión de la dieta obesogénica antes del apareamiento en ratas hembra que presentan obesidad inducida por la dieta de cafetería (modelo postcafetería), en la descendencia y su flexibilidad metabólica para adaptarse a un estrés dietético en la edad adulta. Efecto en la edad adulta.

Como se ha mencionado antes, se conoce que la obesidad materna predispone a un riesgo elevado de sobrepeso a su descendencia. En la presente tesis doctoral hemos estudiado si estos efectos deletéreos en la descendencia pueden revertirse con el control de la dieta antes del apareamiento. En la tarea 2.2 hemos analizado el efecto a largo plazo en el peso corporal de la descendencia de madres del grupo control y postcafetería. Sin embargo, falta conocer cuáles son las alteraciones metabólicas que se generan cuando las crías de madres control o postcafetería, se exponen a un ambiente obesogénico en la edad adulta. El propósito de esta tarea es ver si existe algún fenómeno de programación metabólica, en crías de madres postcafetería, que condicione el desarrollo o protección frente a la obesidad en etapas adultas al estar expuesto a una dieta alta en grasa. Se estudiará la respuesta metabólica a una dieta rica en grasa en tejidos claves implicados en la homeostasis energética.

Por tanto, se decidió dar continuidad al estudio y analizar los efectos más a largo plazo en la descendencia del modelo postcafetería y su respuesta a una dieta obesogénica. Para ello, trabajamos con crías (machos y hembras) de madres control y madres postcafetería que fueron estabuladas hasta edad adulta (6 meses), Figura 2.4. En estos animales se realizó:

- A los 4 meses de edad, la mitad de los animales fueron estabulados con una dieta de engorde (Dieta hiperlipídica y alta en sacarosa comercial, *western diet* D12079B, de *Research Diets*) y la otra mitad continuó con una dieta estándar.

Se realizó un seguimiento del peso corporal, la ingesta, composición corporal, y otros parámetros fisiológicos de interés (bioquímica sanguínea en condiciones de ayuno y/o alimentación ad libitum) y se sacrificaron a los 6 meses para la obtención de los tejidos y posterior análisis. Se analizaron genes relacionados con el metabolismo y homeostasis energética en hipotálamo, hígado y en tejido adiposo retroperitoneal. Se analizaron genes relacionados con el metabolismo lipídico en hígado implicados en la captación de ácidos grasos (Cd36), lipogénesis (Srebf1, Fasn, Scd1), oxidación de ácidos grasos (Ppara, Cpt1a y Pdk4), metabolismo de la glucosa (Gck) y señalización de la insulina y la leptina (Lepr, Insr, Socs, Irs1). También fueron analizados genes expresados en tejido adiposo retroperitoneal implicados en la captación de ácidos grasos (Cd36, Lpl) Mest, Cidea, implicados en la lipogénesis (Pparg, Srebp1c y Fasn), lipolisis (Pnpla2), oxidación de ácidos grasos (Cpt1b) y señalización de la insulina y la leptina (Lepr, Insr). Además se analizó la expresión hipotalámicas de Ghsr, Lepr, Socs3, Stat3, Npy, Pomc. Se determinaron diferentes parámetros plasmáticos como glucosa, leptina y ácidos grasos libres. Además se determinó el contenido de lípidos hepáticos.

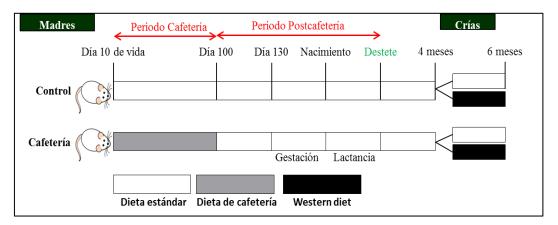


Figura 2.5. Esquema del diseño experimental de la tarea 2.4.

Los resultados obtenidos en esta tarea se presentan en el **capítulo 4**.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. Materiales y Métodos

3.1. Experimentación Animal

El protocolo animal seguido en la presente tesis doctoral fue revisado y aprobado por el Comité de Bioética de nuestra Universidad (Ref 3513 (26/03/2012)) y sigue las recomendaciones generales para el uso y cuidado de animales de laboratorio.

Para el desarrollo de la tesis se utilizaron ratas Wistar hembra, procedentes del laboratorio Charles River. Durante el período de experimentación los animales se mantuvieron en el estabulario de la Universidad de las Islas Baleares (UIB) aclimatados a una temperatura constante de 22 °C, con un período de 12 h de luz y 12 h de oscuridad y con acceso libre a agua y pienso estándar, salvo que se indique lo contrario (Panlab). El peso corporal y la ingesta de alimentos fueron registrados periódicamente. La composición corporal se determinó usando el EchoMRI-700TM (Echo Medical Systems).

Los sacrificios se realizaron en grupos de animales de edades distintas: etapa temprana (22/26 días) y etapa adulta (6 meses), bajo condiciones de alimentación *ad libitum* o ayuno, dependiendo de la fase experimental. Las ratas eran sacrificadas por decapitación con guillotina, y tras la disección del animal se recogían las muestras de interés y se almacenaban a -80°C hasta su análisis. Además se recogía la sangre que se guardaba 1 h a 4°C y después se centrifugaba a 1.000g durante 10 min para obtener el suero que finalmente se guardaba a -20°C hasta su análisis.

3.1.1. Composición de la dieta

En esta tesis doctoral se alimentaba a las ratas con diferentes dietas según el diseño experimental. Básicamente una dieta control o normolipídica, y dos tipos de dietas hiperlipídicas, una dieta hiperlipídica comercial y dieta de cafetería.

<u>Dieta control.</u> Para la alimentación de los animales con dieta control se utilizó pienso estándar (Pienso A04, Panlab). La composición de esta dieta era: 3,3 kcal/g, con 73% de las calorías procedentes de carbohidratos, 8% de grasa y 19% de proteínas.

<u>Dieta hiperlipídica comercial.</u> Para la alimentación de los animales con una dieta hiperlipídica comercial, se utilizó la dieta *Western Diet* D12079B, de *Research Diets*. La composición de esta dieta era: 4,7 kcal/g, con 43% de las calorías procedentes de carbohidratos, 41% de grasa y 17% de proteínas.

Dieta de cafetería. La dieta de cafetería es una dieta hipercalórica rica en grasa que contiene los siguientes alimentos: galletas untadas con paté de hígado y sobrasada (embutido típico mallorquín), dulces (sugus), tocino, magdalenas, chocolate, cacahuetes salados, queso, leche con 20% (p/v) de azúcar, ensaimada (postre típico mallorquín) y zanahoria. La composición de la dieta de cafetería se calcula a partir de los alimentos ingeridos por los animales, ya que no todos los animales comen la misma cantidad de todos los componentes de la dieta, aunque la suelen tener una mayor preferencia por los alimentos ricos en grasas. La composición de macronutrientes de esta dieta, según los datos de ingesta obtenidos, fue: un 40,3% de las calorías en forma de carbohidratos, 46,3% en forma de lípidos y un 13,4% en forma de proteínas. La dieta de cafetería se preparaba y se administraba en exceso diariamente.

3.1.2. Obtención de muestras de leche

Se obtuvieron muestras de leche a los días 5, 10 y 15 del período de lactancia. Para ello, antes de la extracción de la leche las ratas madres fueron separadas de sus crías 3 h para garantizar que las glándulas mamarias estuvieran llenas de leche. Además, para favorecer la extracción de leche, se suministraba a las madres una inyección intraperitoneal de oxitocina (0,4 IU/Kg de peso corporal, Facilpart, Laboratorios syva s.a.u; León, España). Tras 5 min desde la inyección de oxitocina, las madres fueron anestesiadas con isofluorano (IsoFlo, Abbott Laboratories Ltd) y se las mantuvo anestesiadas durante toda la extracción de leche, para reducir el nivel de estrés de los animales. La extracción de leche se realizó de todas las glándulas mamarias de forma manual. Las muestras de leche fueron guardadas a -80°C para su análisis posterior.

3.1.3. Extracción de muestras de sangre in vivo

Para la obtención de muestras de plasma, sin sacrifico del animal, en diferentes edades, y en condiciones de alimentación *ad libitum* o en ayuno, se extraía una muestra de sangre de la vena safena. Para ello se inmovilizaba al animal, se eliminaba el pelo de la zona y, tras desinfectar con etanol y aplicar vaselina, se pinchaba la vena con una aguja estéril y recolectaba la sangre con una pipeta con punta heparinizada o directamente en un tubo tipo *eppendorf* heparinizado.

3.2. Extracción de ARN

La extracción de ARN de hígado, tejido adiposo e hipotálamo se realizó mediante el Kit de extracción E.Z.N.A[®] Total RNA Kit I o mediante el método de extracción por Tripure (Roche).

Aislamiento de ARN mediante E.Z.N.A® Total RNA Kit I.

Para la extracción de ARN de hígado y tejido adiposo se utilizó el Kit de extracción E.Z.N.A[®] Total RNA Kit I (Omega Bio-Tek), que contiene todos los reactivos necesarios para la extracción de ARN y que detallan a continuación. Se pesaron entre 0,100-0,150 g y 0,015-0,020 g de tejido adiposo e hígado respectivamente. Las muestras se homogenizaron en 700 µL de TRK lysis buffer, con ayuda de un homogeneizador (modelo VDI 12, VWR), después se realizó una centrifugación a 13000g durante 5 min a temperatura ambiente con la finalidad de eliminar la grasa y residuos celulares. Al sobrenadante resultante se le añadieron 700 µL de etanol al 70% y se mezcló con vórtex, esta mezcla se introdujo en las columnas HiBind ARN spin y se centrifugó a 10000g durante 1 min a temperatura ambiente. A continuación se realizó un lavado de las columnas con 350 µL de RNA Wash Buffer I y se centrifugó a 10000 g durante 1 min a temperatura ambiente. En cada columna se colocaron 35 µL de ADNasas y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó un lavado de las columnas con RNA Wash Buffer I y se centrifugó a 10000 g durante 1 min a temperatura ambiente. Después se realizaron 2 lavados (500 y 350 µL respectivamente) de las columnas con RNA Wash Buffer II y se centrifugó a 10000 g durante 1 min a temperatura ambiente. Finalmente las columnas se centrifugaron a máxima velocidad (20000 g) durante 2 minutos en tubos colectores vacíos; una vez secas las columnas, se les añadieron 40 µL de H₂O libre de ADNasas y ARNAasas y se centrifugaron a 10000 g durante 2 minutos para recuperar el ARN.

Reactivos:

- Etanol absoluto (Panreac)
- E.Z.N.A® Total RNA Kit I (Omega Bio-Tek)
- H₂O libre de ADNasas y ARNAasas (Sigma)

Aislamiento de ARN mediante Tripure

Para la extracción de ARN de hipotálamo se utilizó el reactivo TriPure (Roche) y se siguió básicamente el protocolo recomendado.

Se homogenizó todo el hipotálamo en 1 mL de TriPure con ayuda de un homogeneizador (modelo VDI 12, VWR). Como paso previo al protocolo de extracción del ARN, las muestras se centrifugaron a 12000 g durante 10 min a 4°C para eliminar la grasa y residuos celulares. Al sobrenadante resultante se le añadió 200 μ L de cloroformo para la separación del ARN, se agitó vigorosamente durante 15 s y se dejó reposar durante 5-15 min a 4°C, posteriormente se centrifugó a 12000 g durante 15 min a 4°C, se recogió la fase acuosa que contiene el ARN. Para precipitar el ARN se añadió 500 μ L de isopropanol y se agitó ligeramente por inversión. Las muestras se dejaron reposar toda la noche a -20°C con la finalidad de mejorar el rendimiento de la extracción. Después las muestras se centrifugaron a 12000 g durante 10 min a 4°C para obtener el precipitado del ARN. El isopropanol fue retirado y se añadió 1 mL de etanol al 75% para lavar el precipitado de ARN. Se agitó vigorosamente 15 s hasta despegar el precipitado y se centrifugó a 7500 g durante 5 min a 4°C. Finalmente se eliminó el resto de etanol. Para resuspender el ARN se utilizó un volumen de H_2 O libre de ADNasas y ARNAasas dependiente del tamaño del precipitado obtenido (entre 50-200 μ L).

Reactivos:

- Cloroformo
- Etanol absoluto (Panreac)
- H20 libre de ADNasas y ARNasas (Sigma)
- Isopropanol TriPure (Roche)

Cuantificación y comprobación del estado del ARN

El ARN extraído se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm utilizando el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000, que permite determinar la concentración usando un 2 μL de muestra con gran reproducibilidad y precisión. El NanoDrop ND-1000 también determina el ratio 260/280 y 260/230. El ratio 260/280 indica la pureza del ARN determinando el grado de contaminación por proteínas; concretamente, un ratio cercano a 2,0 es un indicador de ARN puro, no obstante un ratio mayor a 2,0 indica contaminación por ADN. El ratio 260/230 indica el grado de contaminación por solventes orgánicos, un ratio entre 2,0 y 2,2, es un indicador de ARN puro.

La calidad del ARN se comprobó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%. La electroforesis en gel se basa en separar por tamaño los ácidos nucleicos. En la electroforesis de ARN total se pueden mostrar las subunidades de ARN ribosomal 28S y 18S.

El gel de agarosa se realizó utilizando un tampón de electroforesis a 0.5X (TBE: tampón formado por Tris, Borato y EDTA), teñido con *SYBER*[®] *Safe DNA Gel Stain* (1 μL de *SYBER*[®] *Safe DNA Gel Stain* por cada 10 mL del tampón TBE 0,5X de electroforesis). Para realizar la electroforesis en gel se emplearon 50 ng de ARN mezclados con 5 μL

de tampón de carga. Las condiciones de electroforesis fueron a 80V durante 30 min. El *SYBER*[®] *Safe DNA Gel Stain* presenta la máxima excitación a 280 y 502 nm y la máxima emisión a 530 nm, por ello se visualizó el gel de agarosa en un transiluminador de UV (ChemiGeninus) y la detección de la imagen fue procesada utilizando el programa GeneSnap.

Reactivos:

- Agarosa (Agarose D1 Low EEO, CONDA)
- H20 libre de ADNasas y ARNasas (Sigma)
- SYBER® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen)
- Tampón de carga: 50% de glicerol (Sigma), 50% de agua, 2,5 mg/mL de azul de bromofenol (Panreac)
- Tampón de electroforesis 0,5X. elaborado a partir de Tris, borato y EDTA. 44,5 mM de Tris base, 44,5 mM de ácido bórico y 1 mM de EDTA.

3.3. Análisis de RT-PCR a tiempo real

Con el objetivo de determinar el nivel de expresión de los genes de estudio, primero se realizó una retrotranscripción del ARN de las muestras de interés a ADN copia (ADNc), posteriormente se amplificó y cuantifico el nivel de expresión por PCR a tiempo real.

3.3.1. Retrotranscripción

La retrotranscripción implica la generación de una cadena de ácido desoxirribonucleico (ADN) de doble cadena a partir de un ácido ribonucleico (ARN) de cadena simple. Para la determinación del ARNm de las muestras analizadas, la reacción de retrotranscripción (RT) fue la siguiente: 0,25 μg de ARN total en un volumen de 5 μL con agua libre de ARNasas y se desnaturalizó a 65°C durante 10 min en un termociclador (Thermal Cycler 2720, Applied Biosystems). Posteriormente se añadieron 7,5 μL de RT-mix que contenía para cada tubo de reacción: 1,25 μL de Buffer 10x, 1,25 μL de MgCl2 25 mM, 2 μL de dNTPs 2,5 mM, 0,5 μL de hexámeros sintetizados al azar 50 μM, 0,5 μL de inhibidores de ARNasas 20 U/μL, 0,5 μL de transcriptasa reversa (MuLV RT, *murine leukemia virus reverse transcriptase*) 50 U/μL y 1,5 μL de agua libre de ARNasas. Las condiciones de la reacción de retrotranscripción fueron: 15 min a 20°C, 30 min a 42°C, un paso final de 5 min a 95°C y se mantuvo a 4°C.

Reactivos:

- Buffer 10x (Promega)
- H20 libre de ADNasas y ARNasas (Sigma)
- Inhibidores de ARNasas 20 U/µL (Applied Biosystems)
- MgCl2 25 mM (Promega)
- Hexámeros (Random hexamers 50 μM) (Applied Biosystems)
- Solución de dATP 100 mM (Invitrogen)
- Solución de dCTP 100 mM (Invitrogen)
- Solución de dGTP 100 mM (Invitrogen)
- Solución de dTTP 100 mM (Invitrogen)
- Transcriptasa reversa (MuLV RT, murine leukine virus retrotranscriptase) 50 U/μL (Applied Biosystems)

3.3.2. PCR a tiempo real

La PCR a tiempo real se usó para medir los niveles de expresión de un conjunto de genes en el hígado, tejido adiposo retroperitoneal y en el hipotálamo. La expresión relativa de cada ARNm de interés se normalizó en función de la expresión de un gen de referencia de expresión estable (housekeeping) que se determinó para cada tejido y condición experimental.

Se utilizaron 2 μ L del producto de RT (dilución 1/10). A la muestra se le añadieron 9 μ l de PCR-mix que contiene: 3,1 μ L de H20 libre de ARNasas, 0,45 μ L de cada cebador (a una concentración de (5 μ M) y 5 μ L de un mix comercial Power Syber Green PCR Master Mix. En la Tabla 3.1 se detallan las parejas de cebadores usadas.

Tabla 3.1. Secuencia de cebadores usados en PCR a tiempo real

Símbolo	Nombre genérico	Cebadores Forward (F) y Reverse (R)
Cd36	Molécula CD36 (receptor de la trombospondina)/CD36 molecule (thrombospondin receptor) /	F: GTGGCAAAGAACAGCAGCAA R: CCAACAGACAGTGAAGGCTCA
Cidea	Efector A tipo factor α de fragmentación de ADN inductor de muerte celular /Cell death-inducing DFFA-like effector a	F: TCAGACCCTAAGAGACAACACA R: CATTGAGACAGCCGAGGA
Cpt1a	Carnitina palmitoiltransferasa 1a, hígado/Carnitine palmitoyltransferase 1a, liver	F: CGAGAAGGGAGACAGAGAC R: GGACACCACATAGAGGCAGAA
Cpt1b	Carnitine palmitoyltransferase 1b, muscle/Carnitina palmitoiltransferasa 1b, músculo	F: GCAAACTGGACCGAGAAGAG R: CCTTGAAGAAGCGACCTTTG
Fasn	Ácido graso sintasa/Fatty acid synthase	F: CGGCGAGTCTATGCCACTAT R: ACACAGGGACCGAGTAAT
Gck	Glucoquinasa/Glucokinase	F: CAACTGCGAAATCACCTTCA R: AGCATTTGTGGTGTGTGGAG
Ghsr	Receptor de secretagogos de la hormona del crecimiento/Growth hormone secretagogue receptor	F: TCAGCCAGTACTGCAACCTG R:GGAGAGATGGGATGTGCTGT
Hk2	Hexoquinasa 2/Hexokinase 2	F: CAGCCTAGACCAGAGCATCC R: CGCATCTCTTCCATGTAGCA
Insr	Receptor de insulina/Insulin receptor	F: CTCCTGGGATTCATGCTGTT R: GTCCGGCGTTCATCAGAG
Irs1	Sustrato 1 del receptor de la insulina/Insulin receptor substrate I	F: GCAACCGCAAAGGAAATG R: ACCACCGCTCTCAACAGG
Lep	Leptina/Leptin	F: TCACACACGCAGTCGGTAT R: AGGTCTCGCAGGTTCTCCAG
Lepr	Receptor de la leptina/Leptin receptor	F: AGCCAAACAAAAGCACCATT R: TCCTGAGCCATCCAGTCTCT
Lpl	Lipoproteína lipase/Lipoprotein lipase	F: TATGGCACAGTGGCTGAAAG R: TCTGACCAGCGGAAGTAGGAG
Mest	Transcrito específico del mesodermo/Mesoderm specific transcript	F: CTCAGCTCTCCCCTGCTCT R: GCAATCACTCGATGGAACC
Npy	Neuropéptido Y/Neuropeptide Y	F: TGGACTGACCCTCGCTCTAT R: GTGTCTCAGGGCTGGATCTC
Pdk4	Piruvato deshidrogenasa quinasa, isozima 4/Pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4	F: TCCTTCACACCTTCACCACA R: AAAGAGGCGGTCAGTAATCC
Pnpla2	Triglicélido lipase adiposa (ATGL)/Patatin-like phospholipase domain containing 2	F: TGTGGCCTCATTCCTCCTAC R: AGCCCTGTTTGCACATCTCT
Pomc	Proopiomelanocortina/Proopiomelanocortin	F: CCTGTGAAGGTGTACCCCAATGC R: CACGTTCTTGATGATGGCGTTC
Ppara	Receptor alpha activado por el proliferador peroxisomal/Peroxisome proliferator activated receptor alpha	F: TGTCGAATATGTGGGGACAA R: AAACGGATTGCATTGTGTGA
Pparg	Receptor gamma activado por el proliferador peroxisomal/Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	F: GATCCTCCTGTTGACCCAGA R: TCAAAGGAATGGGAGTGGTC
Scd1	Esteroil-ConezimaA desaturasa 1/Stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	F: ATCCCCTCCTCCAAGGTCTA R: CGGGCCCATTCATATACATC

Slc2a4	Transportador 4 de glucose (GLUT4)/Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4	F: GGCATGCGTTTCCAGTATGT R: GCCCCTCAGTCATTCTCATC
Socs3	Supresor de la señalización de citoquinas 3/Suppressor of cytokine signaling 3	F: ACTGAGCCGACCTCTCTCT R: CCCCTCTGACCCTTTCTTTG
Srebf1	Factor de transcipción de unión al elemento regulador de esteroles 1/Sterol regulatory element binding transcription factor I	F: CCCACCCCTTACACACC R: GCCTGCGGTCTTCATTGT
Stat3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3/Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)	F: GCTGACCAATAACCCCAAGA R: ACACCCTGAGTAGTTCACACCA

La reacción de amplificación se realizó en un termociclador (StepOnePlusTM) y consistió en una desnaturalización de 10 min a 95°C (estas condiciones son específicas para la activación de la polimerasa comercial), posteriormente siguieron 40 ciclos de temperaturas: 15 s a 95°C (desnaturalización) y 1 min a 60°C (alineamiento y elongación), por último una curva final de desnaturalización para verificar la pureza de los productos obtenidos que consistió en: 15 s a 95°C, 1 min a 60 °C y 15 s a 95°C.

Al final de cada ciclo de amplificación se detectó la fluorescencia y se determinó el ciclo en el que el incremento de fluorescencia empieza a ser exponencial, lo que se conoce como ciclo umbral (Ct del inglés *cycle threshold*), con el programa específico del instrumento (StepOne v 2.2.2). La expresión relativa se calculó en base a la eficiencia de la PCR a tiempo real y en función de la Ct de la muestra vs la Ct media de todas las muestras, y se expresó en comparación al gen de referencia, tal y como se indica en (Pfaffl 2001). Además se consideró el 100% la expresión génica del grupo control, y los demás se expresaron en función de dicha expresión.

Reactivos:

- H2O libre de ADNasas y ARNasas (Sigma)
- Power Syber Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)
- Cebadores (Sigma)

3.4. Cuantificación de lípidos hepáticos

La determinación de los lípidos hepáticos se realizó mediante el método de Folch (Folch, Lees et al. 1957). Para ello, se homogenizaron 0,3 g de tejido en 5 mL de cloroformo:metanol (2:1). Posteriormente se filtró el homogenizado con papel del filtro en tubos de vidrio, además se limpiaron el Potter y el filtro con 2 mL de cloroformo:metanol (2:1). Posteriormente se ajustó el volumen de las muestras con 10 mL de cloroformo:metanol (2:1), a esta mezcla se añadieron 2 mL de NaCl 0,45% y se agitó vigorosamente durante 2 min. Se realizó una centrifugación a 3000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente, como resultado final se obtuvieron dos fases: la fase inferior que contiene cloroformo y lípidos (fase clorofórmica) y la fase superior que contiene agua, metanol e impurezas. Se descartó la fase acuosa y se enrazó con metanol puro hasta 10 mL para seguir manteniendo la proporción 2:1. Se añadieron 2 mL de NaCl 0,90%, para limpiar y eliminar impurezas, posteriormente se agitó vigorosamente durante 2 min y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Nuevamente se descartó la fase superior acuosa y se mantuvo la fase inferior clorofórmica, se enrazó con metanol puro hasta 10 mL, se añadieron 2 mL de NaCl 0,90%, se agitó vigorosamente durante 2 min y se centrifugó una vez más a 3000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Se descartó la fase superior acuosa y se mantuvo la fase inferior clorofórmica, una vez más se enrasó hasta 10 mL con cloroformo:metanol (2:1), así se obtuvo el extracto purificado de lípidos. Se colocaron 5

mL de este extracto en un vial de vidrio previamente pesado (peso del vial vacío) tras estar 24 h a 60°C (para eliminar restos de humedad). Finalmente estos viales con el extracto se almacenaron a 60°C durante 24 h y posteriormente se registró su peso (peso del vial lleno).

Los cálculos para determinar la cantidad de lípidos hepáticos es:

Gramos de grasa/mL: (Peso vial lleno – peso vial vacío) / 5 mL del extracto

Gramos de grasa/gramos de tejido: (Gramos de grasa/mL) x (10 mL / peso del tejido homogenizado en gramos)

Reactivos:

- Cloroformo:metanol (2:1): Cloroformo (Panreac) 200 mL y Metanol (Panreac) 100 mL
- Metanol (Panreac)
- NaCl 0,45%: En 250 mL de agua miliQ, 1,125 g de NaCl (Sigma)
- NaCl 0,9%: En 250 mL de agua miliQ, 2,25 g de NaCl (Sigma)

3.5. Determinación de la concentración de glucosa

La determinación de la glucosa se realizó mediante el glucómetro AccuChek Aviva system (Roche Diagnostics). Para ello, se colocaba una gota de sangre sobre la tira reactiva hasta cubrir completamente la ranura por capilaridad a un nivel suficiente para poder obtener una lectura correcta, la medición obtenida leía en la pantalla del glucómetro en mg/dL.

El glucómetro es un biosensor, el principio de la medición se basa en la medición de la cantidad de electrones generados en una reacción enzimática de ciertas sustancias electroactivas con la glucosa de la sangre. Esta cantidad de electrones se transforma en concentración de glucosa. Concretamente, ante la presencia de la coenzima PQQ (quinona de pirroloquinolina), la enzima glucosa deshidrogenasa, enzima contenida en la tira reactiva, convierte la glucosa de la muestra sanguínea en gluconolactona. Esta reacción enzimática produce una corriente eléctrica que el glucómetro traduce en un valor de glicemia (Accuckek).

Reactivos:

- Accu-Chek Aviva system (Roche diagnostics)
- Tiras reactivas Accu-Chek Aviva system (Roche diagnostics)

3.6. Determinación de la concentración de Insulina

Para la determinación de la insulina en suero o plasma se utilizó el kit comercial Rat Insulin ELISA. La técnica empleada se basa en el principio de un inmunoensayo enzimático (ELISA) directo tipo sándwich. Brevemente, la insulina presente en las muestras reacciona con los anticuerpos anti-insulina unidos a los pocillos de la placa y con los anticuerpos anti-insulina conjugados con peroxidasa, con un lavado se pueden eliminar el exceso de anticuerpo marcado con enzimas marcadas, y tras añadir el sustrato específico (tetrametilbenzidina), se genera un producto coloreado que se puede cuantificar por espectrofotometría. La cantidad de producto coloreado que se produce es directamente proporcional a la cantidad de insulina que hay en la muestra. Paralelamente se realiza una curva patrón.

El protocolo consistió en añadir $10~\mu L$ de suero ($25~\mu L$ en el caso del kit para insulina ultrasensible) o de patrón a cada pocillo, posteriormente se añadió $100~\mu L$ del anticuerpo anti-insulina conjugado a un enzima peroxidasa 1x (previamente preparada a partir de un stock 11x, incluido en el kit) a cada pocillo. Se hizo una incubación con agitación de 2~h a temperatura ambiente. Posteriormente se hicieron 6 lavados con tampón de lavado incluido por el kit, se añadieron $200~\mu L$ de sustrato TMB, y se incubó 15~min a temperatura ambiente. Para detener la reacción se añadieron $50~\mu L$ de solución de parada. Finalmente se leyó la absorbancia a 450~nm en un espectrofotómetro para placas de ELISA Sunrise de TECAN.

Reactivos:

- Rat Insulin ELISA (Mercodia)
- Ultrasensitive Rat Insulin ELISA (Mercodia)

3.7. Determinación del índice HOMA-IR

Para determinar la resistencia a la insulina se utilizó el modelo homeostático de resistencia a la insulina (HOMA-IR). Los niveles de HOMA-IR se determinaron al conocer las concentraciones séricas de insulina y glucosa en condiciones de ayuno utilizando la fórmula de Matthews et al (Lucas, Fewtrell et al. 1999).

HOMA-IR: Glucosa en ayuno (mmol/L) x Insulina en ayuno (mU/L) / 22,5

3.8. Determinación de la concentración de Leptina

Los niveles de leptina se determinaron en suero y leche, se utilizó el kit comercial Quantikine ELISA Mouse/Rat Leptin (R&D Systems, USA & Canadá). La técnica empleada se basa en el principio de un ELISA tipo sándwich, donde un anticuerpo policlonal anti leptina se encuentra adherido en los pocillos de la placa. El protocolo consistió en añadir 50 µL de la muestra y del patrón en los pocillos de las placas incluidas en el kit y recubiertas con un anticuerpo policlonal anti leptina. Se realizó una incubación por 2 h a temperatura ambiente. Después de una serie de lavados (cuatro lavados con el tampón de lavado incluido), se añadieron 100 uL el anticuerpo anti leptina conjugado a una peroxidasa de rábano (HRP, horseradish peroxidase) y nuevamente se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Se realizan nuevamente cuatro lavados para eliminar el anticuerpo excedente y se añadió 100 uL de solución sustrato. Se incubó 30 min a temperatura ambiente, protegiendo la placa de la luz exterior. Finalmente se añadió solución de parada y se leyó la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro para placas de ELISA (Sunrise de TECAN). La intensidad del color registrado es proporcional a la cantidad de leptina presente en las muestras.

Se realizaron diferentes diluciones de las muestras con la finalidad de que las lecturas quedaran dentro del patrón: para las muestras de leche las diluciones fueron 1/2, para el suero de crías de 21 días fue de 1/5, para el suero de adultos (postcafeteria 6 meses) fue de 1/10 para machos y 1/5 para hembras.

Reactivos:

- Quantikine ELISA Mouse/Rat Leptin (R&D Systems, USA & Canada)

3.9. Determinación de la concentración de Adiponectina

Los niveles de adiponectina se determinaron en suero y leche. Se utilizó el kit comercial Quantikine ELISA Rat Total Adiponectin/Acrp30 (R&D Systems, USA & Canadá) La técnica empleada se basa en el principio de una ELISA tipo sándwich, donde un anticuerpo policional anti adiponectina se encuentra adherido al interior de los pocillos de la placa. El patrón y las muestras son pipeteadas dentro de los pocillos, al haber adiponectina presente, esta quedará unida al anticuerpo de la placa. Después de una serie de lavados se añade anticuerpo específico anti adiponectina conjugado a una enzima peroxidasa (peroxidasa de rábano, HRP, horseradish peroxidase). Se realizan nuevamente una serie de lavados para eliminar los restos de enzimas no unidas al anticuerpo. La reacción enzimática produce una coloración azul que se transforma en amarillo una vez que la solución de parada ha sido añadida. La intensidad del color registrado es proporcional a la cantidad de adiponectina presente en la muestra.

Se realizaron diferentes diluciones de las muestras con la finalidad de que las lecturas quedaran dentro del patrón: para las muestras de leche las diluciones fueron 1/500, para el suero fue de 1/5000.

Concretamente, el protocolo consistió en añadir 50 µL de la muestra y del patrón en los pocillos de las placas incluidas en el kit recubiertas con un anticuerpo policional anti adiponectina. Se realizó una incubación por 1 h a temperatura ambiente en agitación constante. Se realizaron cuatro lavados con tampón incluido en el kit. Se añadieron 100 µL del anticuerpo conjugado con peroxidasa (HRP) y nuevamente se incubó por 1 h a temperatura ambiente con agitación constante. Se hicieron otros 4 lavados y se añadieron 100 µL de solución sustrato. Nuevamente se incubó durante 30 min a temperatura ambiente, protegiendo la placa de la luz exterior. Finalmente se añadió una solución de parada y se leyó la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro para placas de ELISA (Sunrise de TECAN).

Reactivos:

Quantikine ELISA Rat Total Adiponectin/Acrp30 (R&D Systems, USA & Canadá)

3.10. Determinación de la concentración de Irisina

Los niveles de irisina se determinaron en suero y leche. Se utilizó el kit comercial Irisin (Phoenix Pharmaceuticals, Inc). La técnica está basada en el principio de competitividad enzimática, en la cual, las placas de ELISA contienen un anticuerpo secundario con sus sitios de unión no específicos bloqueados, este anticuerpo detecta la región Fc (Fragmento cristalizable) del anticuerpo primario, a cuyo fragmento Fab (Fragmento de unión al antígeno) se le unirán de forma competitiva el péptido biotinilado (irisina biotinilada) o el péptido (irisina) presente en las muestras "problema". Durante el periodo de incubación, el anticuerpo primario se une al anticuerpo secundario anti irisina de las placas de ELISA. Posteriormente una serie de lavados eliminan los anticuerpos que no han llegado a unirse. La biotina conjugada interactúa con la peroxidasa de rábano unida a estreptavidina (SA-HRP, *streptavidin-horseradish peroxidase*), la cual cataliza reacción con la solución sustrato para producir una solución de color azul. La reacción enzimática es detenida al añadir ácido hidroclorídrico (HCl). La intensidad del color registrado es inversamente proporcional a la cantidad de irisina presente en la muestra.

Se realizaron diluciones de las muestras con la finalidad de que las lecturas quedaran dentro del patrón: tanto para las muestras de leche como para las muestras de suero la dilución fue de 1/6. El protocolo consistió en añadir 50 μ L de la muestra y del patrón en los pocillos de las placas incluidas en el kit, junto con 50 μ L del anticuerpo primario. Se hizo una incubación de 2 h a temperatura ambiente. Se añadió 50 μ L de péptido biotinilado y nuevamente se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Se realizaron cuatro lavados con tampón incluido en el kit y se añadieron 100 μ L de solución SA-HRP. Se volvió a incubar 1 h a temperatura ambiente y se realizaron otros cuatro lavados. Se añadió solución sustrato (TMB) y se realizó una última incubación de 7 min a temperatura ambiente, se detuvo la reacción con 100 μ L de 0,5M HCL. Finalmente se leyó la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro para placas de ELISA (Sunrise de TECAN).

Reactivos:

- Irisin (Human, Mouse, Rat) ELISA KIT (Phoenix Pharmaceuticals, Inc)

3.11. Determinación de ácidos grasos libres circulantes

Los niveles de ácidos grasos no esterificados (NEFA, *non esterified fatty acids*) se determinaron en suero. Se utilizó el kit colorimétrico enzimático NEFA-HR (2) (WAKO-Chemicals). El principio de la técnica se basa en que los NEFA de la muestra son convertidos a Acyl-CoA, adenosín monofosfato (AMP) y ácido pirofosfórico (PPi) por la acción de la Acyl-CoA sintetasa (ACS) bajo la presencia de coenzima A (CoA) y trifosfato de adenosina (ATP). El Acyl-CoA resultante de la reacción es oxidado por la acción de la Acyl-CoA oxidasa (ACOD), uno de los productos de dicha oxidación es el peróxido de hidrógeno. En la presencia de peroxidasa (POD), el peróxido de hidrógeno produce una pigmentación azul púrpura por oxidación cuantitativa con 3-Metil-N-(β-Hidroxietil)-Anilina (MEHA) y 4-aminoantipirina (4-AA). Finalmente la concentración de NEFA se obtiene al medir el nivel de absorbancia del color azul púrpura.

El protocolo consistió en añadir 7 μl de la muestra en placas de ELISA (96 pocillos), posteriormente se añadió 150 μL del reactivo 1 (reconstituido previamente con la solución A (buffer fosfato 50 mmol/L, pH 7,0 y ácida sódica 0,05%) y la solución color A (0,53 U/mL ACS, 0,31 mmol/L CoA, 4,3 mmol/L ATP, 1,5 mmol/L 4-AA, 2,6 u/mL AOD, 0,062% acida sódica, y color A 0,8%) incluidos en el kit), se agitó vigorosamente la muestra y se incubó por 5 min a 37°C. A continuación se añadieron 75 μL del reactivo 2 (reconstituido previamente con solución B (MEHA) y la solución color B (12U/mL ACOD y 14U/mL POD) incluidos en el kit), nuevamente se agitó vigorosamente y se dejó reposar durante 5 min a temperatura ambiente. Finalmente se leyó la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro para placas de ELISA (Sunrise de TECAN).

Reactivos:

kit calorimétrico enzimático NEFA-HR(2) (WAKO-Chemicals)

3.12. Determinación de triglicéridos circulantes

Los niveles de triglicéridos se determinaron en suero, se utilizó el kit comercial *Serum Triglyceride Determination* (Sigma-Aldrich). El procedimiento se basa en la hidrolisis enzimática de los triglicéridos en glicerol y ácidos grasos libres por acción de la lipoproteína lipasa, el glicerol producido puede ser cuantificado después de pasar por una serie de reacciones enzimáticas: primero el glicerol es fosforilado formando

glicerol-1-fosfato (G-1-P), dicha reacción es catalizada por la glicerol quinasa (GK). Después G-1-P es oxidado por acción de la glicerol fosfato oxidasa (GPO) resultando en la formación de dihidroxi-acetona fosfato (DAP) produciendo peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Finalmente se produce la catálisis de H₂O₂ para producir un colorante de quinoneimina que muestra una absorbancia máxima de 540 nm.

El protocolo consistió en añadir 240 μL del reactivo *Free Glycerol*, incluido en el kit, en una placa de ELISA (96 pocillos). Se añadieron 3 μL de la muestra y el patrón, después se agitó suavemente la placa de ELISA. Se incubó durante 5 min a 37°C y se realizó una lectura de la absorbancia inicial a 540 nm en un espectrofotómetro para placas de ELISA (Sunrise de TECAN). Se añadieron 60 μL del *Triglyceride reagent*, se agitó una vez más y se volvió a incubar por 5 min a 37°C. Finalmente se realizó una lectura de la absorbancia final a 540 nm.

Reactivos:

- Serum Triglyceride Determination kit (Sigma-Aldrich)

3.13. Determinación del β-Hidroxibutirato circulante

Los niveles de cuerpos cetónicos se determinaron en suero, se utilizó el kit comercial β -hydroxybutyric acid (b-HBA) (Ben Biochemical enterprise, Milano, Italy). El principio de la técnica se basa en la actividad enzimática de la BHB deshidrogenasa, la cual cataliza la oxidación de BHB en acetoacetato, simultáneamente se produce la reducción de NAD⁺ a NADH. El incremento de absorbancia de NADH es directamente proporcional a la cantidad de BHB de la muestra.

Se realizó una dilución 1/2 de las muestras con la finalidad de que las lecturas quedaran dentro del patrón. El protocolo consistió en añadir 10 µL de la muestra o patrón en una placa de ELISA (96 pocillos) más 180 µL de reactivo de trabajo (*working reagent*), incluido en el kit, se agitó ligeramente y se incubó 10 min a 37°C. Se realizó una primera lectura con las siguientes condiciones: 355 nm de excitación y 460 nm de emisión de la fluorescencia. Posteriormente se añadieron 30 µL del reactivo 3 en cada pocillo y se agitó ligeramente 10 min. Finalmente se realizó una segunda lectura con las condiciones antes mencionadas en un espectrofluorímetro para placas de ELISA (Mithras LB 940).

Reactivos:

- Kit β- hydroxybutyrric acid (b-HBA) (Ben Biochemical enterprise, Milano, Italy)

3.14. Western blot

El western blot es un método semicuantititativo para identificar proteínas específicas a partir de una mezcla más compleja de estudio. Se emplea una electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (PAGE) en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS) para hacer una separación de las proteínas en base a su peso molecular. Posteriormente las proteínas son transferidas a una membrana adsorbente donde es detectada la proteína en estudio utilizando anticuerpos específicos para dicha proteína. La membrana es escaneada y se realiza una cuantificación de las bandas.

Preparación de las muestras

Se homogenizaron muestras de hígado con homogeneizador (modelo VDI 12, VWR) en hielo y en una dilución 1:5 (w:v), empleando buffer de lisis 1x RIPA (*radio-immunoprecipitation assay buffer*) más inhibidor de proteasas y fosfatasas (Thermo Fisher, Rockford, USA). Después de la homogenización se hizo una centrifugación a 7.500 x g durante 2 min y a 4°C, el sobrenadante resultante se utilizó para medir la concentración de proteínas.

El contenido total de proteínas hepáticas se cuantificó con el kit comercial *Pierce BCA protein assay* (Thermo acientific) usando albúmina (BSA: Bovine Serum Albumin en concentración de 2 mg/mL) como estándar. Se añadieron 25 μL de las muestras y el patrón en una placa de ELISA (96 pocillos) más 200 μL de WR (*Working reagent*) incluido en el kit. La placa se cubrió para protegerla de la luz exterior y se incubó durante 30 min a 37°C. Finalmente se leyó la absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro para placas de ELISA (Sunrise de TECAN).

Para la electroforesis, las muestras se prepararon diluyendo 100 µg de proteína total en tampón de carga (Laemmli Sample buffer, 1 µL de tampón de carga por cada 10 µg de proteína total), las muestras se calentaron 3 min en agua en ebullición para desnaturalizar las proteínas.

Reactivos:

- HaltTM Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail 100x (Thermo Fisher Scientific)
- RIPA Lysis buffer 1x: 50 mM Tris-HCL (Sigma) buffer pH=7.4, 150 mM NaCl (Panreac), ácido desoxicolico 0,25% (Panreac), NP40 1% (Sigma) y EDTA 1 mM (Merck)
- Pierce BSA Protein assay kit (Thermo scientific)
- Albúmina estándar (2 mg/mL) (Thermo scientific)
- Tampón de carga (Laemmli sample buffer): Tris-HCL 0.5 mM (Sigma) pH=6.8, SDS 5% (Sigma), glycerol 10% (Sigma), β-mercaptoetanol 5% (Sigma) y azul bromofenol 1% (Panreac)

Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)

100 μg de proteína total fueron fraccionadas usando geles de policrilamida *Criterion*TM TGXTM Precast de 4-15% (Bio-Rad), usando tris-glicina como buffer de electroforesis. Se utilizó un marcador de peso molecular bicolor (Bio-Rad). Las condiciones de la electroforesis fueron 120 V, 90 min.

Reactivos:

- Gel de policrilamida Precast 4-15 % (CriterionTMTGXTM, Bio-Rad)
- Tris-glicina 0,5x pH=8.3: Tris-Base 0,025 M (Sigma), glicina 0,195 M (Sigma) v SDS 0,02% (Sigma)
- Marcador de peso molecular bicolor (Precision Plus ProteinTM Standard, Dual color (Bio-Rad)

Electrotransferencia

Una vez hecha la electroforesis se hizo una transferencia de las proteínas fraccionadas hacia una membrana de nitrocelulosa de 0,2 µm, para ello se utilizó el sistema de

transferencia turbo Trans-blot (Bio-Rad), el proceso consiste en humedecer 7 papeles de transferencia en la solución Trans-blot Turbo Transfer buffer colocarlos en el fondo del cassette electrodo (ánodo). A continuación la membrana de transferencia también se humedeció con la misma solución y se colocó sobre la parte superior de la pila humedecida de papeles dentro del *cassette*, después el gel se colocó sobre la membrana. Finalmente se colocaron sobre el gel 7 papeles de transferencia humedecidos en solución Trans-blot Turbo Transfer buffer). Se coloca el cassette (cátodo) para cerrar el sistema de transferencia y se inserta dentro del equipo. Las condiciones de electrotransferencia fueron: 7 min a 2.5 A constantes hasta 25 V.

Reactivos:

- 0,2 µm nitrocellulose membrane (Bio-Rad)
- Trans-Blot[®] TurboTM Transfer buffer solution (Bio-Rad)
 Trans-Blot[®] TurboTM Midi Nitrocellulose Transfer Kit (Bio-Rad)

Imnunodetección

La membrana fue bloqueada con una solución de bloqueo (Odyssey®) en TBS 1x (1:1) durante 12 h a temperatura ambiente. Después del bloqueo, la membrana fue lavada con TBS con Tween-20 al 0,1% durante 60 s y posteriormente incubada 1 h a temperatura ambiente en agitación constante con anticuerpo primario específico. Después de la incubación la membrana fue lavada 4 veces durante 5 min cada vez a temperatura ambiente con TBS con Tween-20 al 0,1% en agitación constante. Después la membrana fue incubada 30 min a temperatura ambiente con agitación constante y con protección de la luz exterior con anticuerpo secundario conjugado con un fluoróforo (IRDye 800cW or IDEye 680ye 680LT). El anticuerpo secundario se preparó según la especie huésped del anticuerpo primario.

Para la detección las membranas fueron lavadas 4 veces durante 5 min cada vez en TBS con Tween-20 al 0.1% a temperatura ambiente en agitación constante. Se realizó un último lavado con TBS durante 5 min.

Reactivos:

- Odyssey® Blocking Buffer Solution (LI-COR Biosciences)
- TBS 10x wash buffer, pH 7.4: 500 ml de Tris-C1 1M (Sigma), pH 7.4 y 300 ml de NaCl 5M (Panreac) y arrasar hasta 1 L con agua destilada.
- TBS 1x con Tween-20 al 0,1%: TBS 10x diluido 1:10 con agua destilada y 1 g de Tween-20 (Sigma)
- Anticuerpo primario policional de conejo anti receptor de insulina (InsR) de rata (Cell Signalling Technology, Ref:3025), diluido 1:2000 en TBS 1x con 0,1% de BSA (Sigma), 0,1% de ácida sódica (Sigma) y 0,1% de Tween-20 (Sigma)
- Anticuerpo primario policional de conejo anti AKT de rata (Cell Signalling Technology, Ref:9272), diluido 1:2000 en TBS 1x con 0,1% de BSA (Sigma), 0,1% de ácida sódica (Sigma) y 0,1% de Tween-20 (Sigma)
- Anticuerpo primario policional de ratón anti AMPK de rata (Cell Signalling Technology, Ref:2793), diluido 1:2000 en TBS 1x con 0,1% de BSA (Sigma), 0,1% de ácida sódica (Sigma) y 0,1% de Tween-20 (Sigma)
- Anticuerpo primario policional de conejo anti AMPK-p de rata (Cell Signalling Technology, Ref:2535), diluido 1:2000 en TBS 1x con 0,1% de BSA (Sigma), 0,1% de ácida sódica (Sigma) y 0,1% de Tween-20 (Sigma)

- Anticuerpo secundario anti anticuerpos de conejo (Canal de detección infrarroja: 800) (LI-COR Biosciences), diluido 1:20000 en Odyssey® Blocking Buffer y TBS 1x con 0,1% de BSA (Sigma), 0,1% de ácida sódica (Sigma) y 0,1% de Tween-20 (Sigma)
- Anticuerpo secundario anti anticuerpos de ratón (Canal de detección infrarroja: 680) (LI-COR Biosciences), diluido 1:20000 en Odyssey® Blocking Buffer y TBS 1x con 0,1% de BSA (Sigma), 0,1% de ácida sódica (Sigma) y 0,1% de Tween-20 (Sigma)

Escaneado y cuantificación

Las membranas fueron escaneadas en un escáner Odyssey[®] con sistema de imagen infrarroja (LI-COR Biosciences) en los canales de detección apropiados respecto al anticuerpo escaneado (canal verde en 700 nm cuando se utilizó el anticuerpo secundario anti-anticuerpos de ratón y canal rojo en 800 nm cuando se utilizó el anticuerpo secundario anti-anticuerpos de conejo. Para la cuantificación de las bandas se utilizó el Odyssey[®] software V 3.0 (LI-COR Biosciences)

Control de carga

Para comprobar una correcta carga uniforme de las muestras, se utilizó la beta actina como control de carga. Para ello se incubaron las membranas con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-β-actina diluido 1:2000 en TBS 1x con 0,1% de BSA (Sigma), 0,1% de ácida sódica (Sigma) y 0,1% de Tween-20 (Sigma).

3.15. Análisis estadístico

Todos los datos se presentan como media \pm el error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico usado fue elegido según el objetivo experimental. Para estudiar las diferencias individuales entre grupos de experimentación con comparaciones múltiples, se aplicó el análisis de varianzas de dos factores (ANOVA de 2 factores), o un análisis de medidas repetidas seguido del test de Bonferoni, según el caso. Las comparaciones simples (dos grupos de experimentación) se realizaron mediante el test de la t de Student. El software utilizado para el análisis fue SPSS para Windows versión 20. En todos los casos el nivel de confianza fue del 95% (p < 0,05), y se identificó en la gráfica cuando fue diferente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Capítulo 1

La sobre alimentación con dieta de cafetería en ratas macho jóvenes altera la respuesta adaptativa a condiciones de alimentación/ayuno e incrementa la adiposidad independientemente del peso corporal

En este estudio se pretende analizar en ratas jóvenes el efecto de un periodo corto de exposición a una dieta de cafetería en su respuesta metabólica a condiciones de alimentación/ayuno en tejidos claves implicados en la homeostasis energética. Para ello ratas lactantes macho de 10 días de edad fueron alimentadas con una dieta control o una dieta de cafetería durante 12 días y fueron sacrificados en condiciones de alimentación ad libitum o tras 12 h de ayuno. Se analizó en el hígado, tejido adiposo blanco retroperitoneal e hipotálamo la expresión de genes claves implicados en el metabolismo energético. A pesar de que no se observaron diferencias en el peso corporal, los animales alimentados con dieta de cafetería presentaron casi el doble de grasa corporal que los animales control. Los animales alimentados con dieta de cafetería también mostraron un mayor ingesta, mayor leptinemia y una alteración en la expresión hipotalámica del Neuropéptido Y, lo que sugiere una alteración en el control de la ingesta. A diferencia de los controles, las ratas alimentadas con dieta de cafetería no presentaron un descenso en la expresión de Pparg, Srebf1 o Cidea bajo condiciones de ayuno, y mostraron una menor expresión de Pnpla2 que las controles. En el hígado, comparado con los animales del grupo control, los animales alimentados con dieta de cafetería presentaron: i) una menor expresión de los genes relacionados con la captación de ácidos grasos y con la lipogénesis bajo condiciones de alimentación ad libitum; ii) una mayor expresión de los genes relacionados con la oxidación de los ácidos grasos y la glucoquinasa bajo condiciones de ayuno; iii) una mayor expresión del receptor de leptina y del receptor de insulina; y, a nivel de proteína, mayores niveles del receptor de insulina y de la relación pAMPK/AMPK. Por tanto, un periodo corto de exposición a la dieta de cafetería en ratas jóvenes macho es suficiente para alterar la respuesta metabólica a condiciones de alimentación/ayuno en tejidos claves implicados en la homeostasis energética, particularmente en el tejido adiposo blanco, y así inducir una acumulación exacerbada de grasa corporal y un aumento en el riesgo metabólico, sin cambios aparentes en el peso corporal.

4.1.1. Resultados

Peso corporal, ingesta y parámetros sanguíneos

A día 21 de edad los animales fueron destetados y estabulados de forma individual. Se midió la ingesta total de alimentos consumidos por los animales sacrificados en condiciones de alimentación ad libitum, durante las últimas 12 h. En el caso de los animales alimentados con dieta de cafetería, se registró la cantidad exacta de cada alimento ingerido, debido a que no todos los componentes de la dieta se consumen de igual manera (Ribot, Rodriguez et al. 2008). Observamos que los animales alimentados con dieta de cafetería consumen tres veces más Kcal que los animales control (p<0,05, test de la t de Student) (Tabla 4.1). La dieta de cafetería consumida, calculada según los alimentos consumidos por los animales, aportó un 40,3% de energía en forma de carbohidratos, un 46,3% en forma de grasa y un 13,4% en forma de proteínas, mientras que la dieta control aportó un 73% de energía en forma de carbohidratos, un 8% de grasa y un 19% de proteínas. Como se muestra en la Tabla 4.1, aunque tras 12 días de alimentación con dieta de cafetería no se observaron cambios significativos en el peso corporal, las crías alimentadas con dieta de cafetería presentan un mayor contenido de grasa corporal que las controles, así como un mayor tamaño de los principales depósitos de tejidos adiposos blancos (inguinal, mesentérico, retroperitoneal y epididimal), y un menor peso del hígado. No se encontró correlación entre el contenido de grasa y el peso corporal, lo cual es una evidencia de que el incremento de adiposidad es independiente del peso corporal. Los animales en condición de ayuno presentaron un menor peso corporal, menor contenido de grasa y menor peso del hígado en comparación con los animales en condición de alimentación ad libitum. Cabe destacar, que la reducción del contenido de grasa corporal y el tamaño del hígado fue mayor en los controles que en los animales alimentados con dieta de cafetería (p<0,05, efecto interactivo entre dieta y ayuno, ANOVA de dos factores). Además, en los animales control, pero no en los animales cafetería, el tamaño del tejido adiposo inguinal, retroperitoneal y epididimal fue significativamente menor en el grupo de ayuno comparado con los animales alimentados *ad libitum* (p<0,05, test de la t de Student).

Los niveles circulantes de leptina, triglicéridos y ácidos grasos libres fueron mayores en los animales alimentados con dieta de cafetería en comparación con el grupo control (p<0,05, efecto dieta, ANOVA de dos factores). Los niveles de glucosa fueron menores en el grupo cafetería, pero solamente bajo condición de alimentación *ad libitum* (p<0,05, test de la t de Student). Tanto los animales control como cafetería mostraron menores niveles circulantes de glucosa y leptina en condición de ayuno (p<0,05, efecto ayuno, ANOVA de dos factores). No se encontraron cambios significativos en los niveles de insulina. Bajo condiciones de alimentación *ad libitum*, los niveles circulantes de leptina se correlacionan positivamente con el contenido de grasa corporal (r=0,850, p<0,001) pero no con el peso corporal (r=0,011, p=0,960).

Tabla 4.1. Ingesta de alimentos nocturna, peso corporal, contenido de grasa, peso de los diferentes depósitos de tejido adiposo blanco (TAB) e hígado, y niveles circulantes de glucosa, leptina, insulina, ácidos grasos libres y triglicéridos de ratas macho de 22 días de edad alimentados con dieta control o dieta de cafetería desde día 10 de vida y sacrificados en condiciones de alimentación *ad libitum* o tras 12 h de ayuno.

	Dieta	Control	Dieta (
	Ad libitum	Ayuno	Ad libitum	Ayuno	ANOVA
Ingesta de alimentos (kcal)	$23,4 \pm 2,2$		70,6 ± 2,0#		
Peso corporal (g)	$54,7 \pm 1,5$	45,6 ± 1,1*	$52,6 \pm 1,5$	48,7 ± 1,2*	F
Grasa corporal (g)	$4,4 \pm 0,3$	2,2 ± 0.1*	8,0 ± 0,5#	6,3 ± 0,5*#	D, F
Grasa corporal (%)	$8,0 \pm 0,4$	4,9 ± 0,2*	15,2 ± 0,7#	12,7 ± 0,7*#	DxF
TAB inguinal (mg)	501 ± 29	375 ± 32*	844 ± 81#	862 ± 72#	D
TAB mesentérico (mg)	203 ± 17	164 ± 16	331 ± 31#	334 ± 21#	D
TAB retroperitoneal (mg)	80 ±7	51 ± 5*	216 ± 18#	184 ± 19#	D, F
TAB epididimal (mg)	97 ± 8	68 ± 10*	200 ± 15#	178 ± 17#	D
Hígado (g)	$2,39 \pm 0,10$	1,36 ± 0,04*	2,21 ± 0,08#	1,55 ± 0,06*	DxF
Glucosa (mg/dL)	171 ± 6	121 ± 5*	156 ± 4#	120 ± 5*	F
Leptina (pg/mL)	1423 ± 144	171 ± 33*	4418 ± 334#	739 ± 72*#	D, F
Insulina (µg/L)	$0,087 \pm 0,021$	$0,072 \pm 0,021$	0,062±0,010	0,049±0,006	
Triglicéridos (mg/mL)	$0,934 \pm 0,170$	0,467 ± 0,045*	$1,010 \pm 0,168$	0,746 ± 0,097#	D
NEFAs (mM)	$0,550 \pm 0,086$	0,992 ± 0,112*	$0,721 \pm 0,152$	$0,970 \pm 0,094$	D

Abreviaturas: NEFAs, ácidos grasos libres no esterificados; TAB, tejido adiposo blanco;

Estadística: # Dieta de cafetería vs dieta control (p<0,05, test de la t de Student). *, Ayuno vs alimentación *ad libitum* (p<0,05, test de la t de Student). Los datos son la media ± SEM (n=10-13), F, efecto condición de alimentación (*ad libitum*/ayuno); D, efecto dieta (control/cafetería); DxF, efecto interactivo entre dieta y condición de alimentación, (p<0,05, ANOVA de dos factores).

Expresión de genes relacionados con el balance energético en el hipotálamo

Los niveles de expresión de ARNm de Insr, Lepr, Ghsr, Socs3, Stat3, Npy y Pomc en el hipotálamo se muestran en la Figura 4.1. El nivel de expresión de Ghsr fue menor en los animales alimentados con dieta de cafetería en comparación con el grupo control (p<0,05, efecto dieta, ANOVA de dos factores) mientras que no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión del Insr y Lepr. Los niveles de ARNm en los receptores mencionados anteriormente no mostraron cambios bajo condición de ayuno comparado con los niveles en los animales de alimentación ad libitum. La expresión de Socs3 fue menor en los animales en ayuno comparados con los animales alimentados ad libitum (p<0,05, efecto ayuno, ANOVA de dos factores), especialmente en los animales control (p<0,05, test de la t de Student). Se observó una tendencia similar en los niveles de expresión de ARNm de Stat3 (p=0,060, efecto ayuno, ANOVA de dos factores). El grupo cafetería presentó menores niveles de expresión de ARNm del Npy que los controles tanto en condiciones de alimentación ad libitum como en ayuno (p<0,05, efecto dieta, ANOVA de dos factores). No se encontró una diferencia significativa en la expresión de Pomc. Cabe destacar que los animales control mostraron un ratio mayor Npy/Pomc que los animales alimentados con dieta de cafetería, particularmente bajo condición de ayuno; sin embargo, el incremento inducido por el ayuno este ratio solo fue significativo por el test de la t de Student en los animales control.

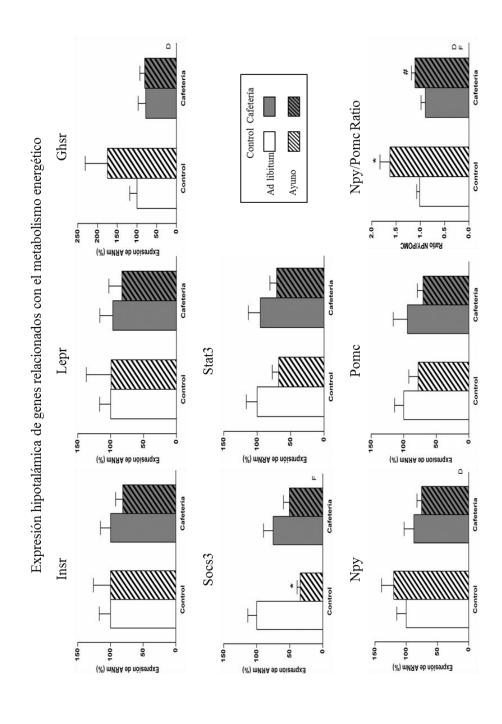


Figura 4.1. Expresión de genes relacionados con el metabolismo energético en el hipotálamo de ratas macho de 22 días de edad, alimentadas con una dieta control o con dieta de cafetería desde el día 10 de vida hasta su sacrificio bajo condiciones de alimentación o ayuno de 12h. Los datos son la media ± SEM (n=10-13). Los genes analizados fueron: InsR, Lepr, Ghsr, Socs3, Stat3, Npy y Pomc. Estadística: F, efecto condición de alimentación (ad libitum/ayuno); D, efecto dieta (control/cafetería), (p<0,05, ANOVA de dos factores). # dieta de cafetería versus dieta control (p<0,05 test de la t de Student), *, condición de ayuno versus ad libitum (p<0,05 test de la t de Student).

Expresión de genes relacionados con el metabolismo energético en el hígado

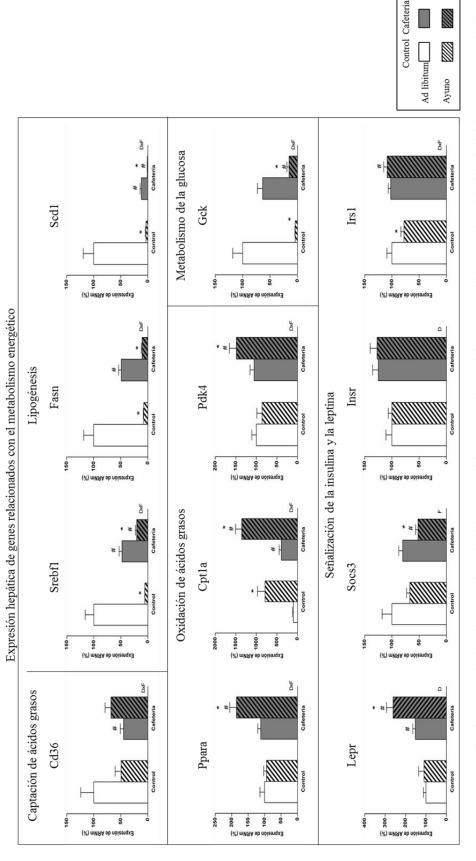
Los resultados que muestran la expresión de genes que participan en la utilización y metabolismo de los nutrientes en el hígado se muestran en la Figura 4.2.

Los animales control en condiciones de alimentación *ad libitum* presentan mayores niveles de expresión de Cd36 en hígado comparado con el grupo cafetería (p<0,05, test de la t de Student). En condiciones de ayuno, los niveles de ARNm para Cd36 tienden a disminuir en los controles pero incrementan en los animales alimentados con dieta de cafetería (p<0,05, efecto interactivo entre dieta y ayuno, ANOVA de dos factores).

La expresión de genes lipogénicos (Srebf1, Fasn y Scd1) y glucoquinasa fue menor en animales en ayuno comparados con los animales en condición de alimentación *ad libitum* tanto en el grupo control como en el grupo cafetería, aunque los animales control, comparados con los animales del grupo cafetería mostraron mayor expresión de estos genes bajo condición de alimentación *ad libitum* (p<0,05, efecto interactivo entre dieta y ayuno, ANOVA de dos factores). De hecho, el ratio ayuno/alimentación para la expresión de ARNm de Srebf1, Fasn y Scd1 fue mayor en el grupo cafetería (0,43, 0,22 y 0,08 respectivamente) que en el grupo control (0,06, 0,08 y 0,03 respectivamente).

Por otro lado, los animales del grupo cafetería en estado de ayuno, mostraron mayores niveles de expresión de ARNm de genes relacionados con la oxidación de ácidos grasos: Ppara, Cpt1a y Pdk4 (p<0,05, efecto interactivo entre dieta y ayuno, ANOVA de dos factores).

Con respecto a la expresión de genes relacionados con la señalización de la leptina y la insulina, los animales del grupo cafetería presentaron una mayor expresión del ARNm de los receptores de leptina e insulina (p<0,05, efecto dieta, ANOVA de dos factores). Con el ayuno se observó un incremento en la expresión de Lepr en animales del grupo cafetería, pero no en el grupo control (p<0,05, test de la t de Student), y una disminución en los niveles de expresión de Socs3 en ambos grupos (sólo significativo por test de la t de Student en los animales cafetería) y de Irs1 solamente en el grupo control (p<0,05, efecto interactivo entre dieta y ayuno, ANOVA de dos factores).



el día 10 de vida hasta su sacrificio bajo condiciones de alimentación ad libitum o y ayuno de 12h. Los datos son la media ± SEM (n=10-13). Los genes analizados Figura 4.2. Expresión de genes relacionados con el metabolismo energético (captación de ácidos grasos, lipogénesis, oxidación de ácidos grasos, metabolismo de fueron: Cd36, Srebf1, Fasn, Scd1, Ppara, Cpt1a, Pdk4, Gck, Lepr, Socs3, Insr e Irs1. Estadística: F, efecto condición de alimentación (ad libitum/ayuno); D, Efecto la glucosa y señalización de la leptina y la insulina) en hígado de ratas macho de 22 días de edad, alimentados con una dieta control o con dieta de cafetería desde dieta (control/cafetería); DxF, efecto interactivo entre dieta y condición de alimentación, (p<0,05, ANOVA de dos factores). #, dieta de cafetería versus dieta control (p<0,05, test de la t de Student). *, condición de ayuno versus ad libitum (p<0,05, test de la t de Student).

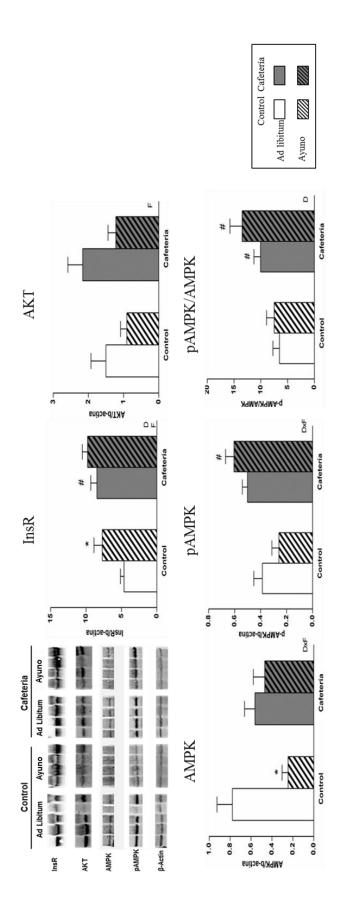
En vista de las diferencias encontradas en la expresión de genes relacionados con la señalización de la insulina, analizamos los niveles de proteínas del InsR y de la AKT (proteínas de la cascada de señalización de la insulina) por western blot. Los resultados se muestran en la Figura 4.3.

Como ocurre con los niveles de expresión de ARNm, los animales alimentados con dieta de cafetería también presentaron mayores niveles de la proteína InsR comparado con los controles (p<0,05, efecto dieta, ANOVA de dos factores). Además, los niveles de la proteína InsR fueron más elevados tanto en grupo control como en el grupo cafetería bajo condiciones de ayuno (p<0,05, efecto ayuno, ANOVA de dos factores), aunque este incremento fue más marcado y significativo por test de la t de Student en el grupo control (p<0,05).

Respecto a la proteína AKT, no se encontraron diferencias significativas entre los animales control y cafetería; sin embargo ambos grupos mostraron bajos niveles de esta proteína en situación de ayuno en comparación con la condición *ad libitum* (p<0,05, efecto ayuno, ANOVA de dos factores).

Conociendo el papel de la AMPK como sensor energético en la regulación del metabolismo celular, también analizamos los niveles de esta proteína y su forma activa fosforilada (pAMPK). Los resultados se muestran en la Figura 4.3.

Los animales control mostraron bajos niveles de la proteína AMPK bajo condiciones de ayuno comparado con el grupo de alimentación *ad libitum*, mientras que los niveles de AMPK en los animales cafetería permanecieron estables independientemente de la condición de alimentación (p<0,05, efecto interactivo entre dieta y ayuno, ANOVA de dos factores). Además los animales en estado de ayuno del grupo cafetería presentaron altas cantidades de pAMPK comparadas a los controles (p<0,05, test de la t de Student). El efecto de la dieta fue más evidentes para el ratio pAMPK/AMPK, lo que sugiere una mayor activación de la vía AMPK en los animales del grupo cafetería comparado con los controles (p<0,05, efecto dieta, ANOVA de dos factores).



alimentados con una dieta control o dieta de cafetería desde el día 10 de vida hasta su sacrificio bajo condiciones de alimentación ad libitum o ayuno de 12h. Los datos son la media \pm SEM (n=10-13) expresados en unidades arbitrarias (UA) y corregidos por β -actina. Resultados representativos se muestra en la parte superior izquierda de la imagen. Estadística: F, efecto condición de alimentación (ad libitum/ayuno); D, Efecto dieta (control/cafetería); DxF, efecto interactivo entre dieta y condición de alimentación, (p<0,05, ANOVA de dos factores). #, dieta de cafetería versus dieta control (p<0,05, test de la t de Student). *, condición de ayuno Figura 4.3. Niveles proteicos de InsR, AKT, AMPK y AMPK fosforilada (pAMPK) (medidos por western blot) en hígado de ratas macho de 22 días de edad, versus ad libitum (p<0,05, test de la t de Student).

Expresión de genes relacionados con el metabolismo energético en tejido adiposo blanco retroperitoneal.

El depósito retroperitoneal fue elegido como representativo del TAB debido a su relación con el desarrollo de la resistencia a la insulina y diabetes tipo 2 (Gabriely, Ma et al. 2002). Los resultados que muestran la expresión de genes relacionados con la utilización y metabolismo de nutrientes en este tejido adiposo se presentan en la Figura 4.4.

Los animales en condición de ayuno presentan mayores niveles de ARNm para Lpl comparado con los animales en condición de alimentación ad libitum (p<0,05, efecto ayuno, ANOVA de dos factores); esta diferencia se presentó especialmente en el grupo cafetería (p<0,05, test de la t de Student). No se encontraron diferencias en la expresión de Cd36. Como tendencia general, se encontró un efecto interactivo entre el tipo de dieta y las condiciones de alimentación en genes relacionados con la captación y metabolismo de la glucosa, lipogénesis, Cidea (que participa en la fisiología de las gotas lipídicas), e Insr. Específicamente, los animales control bajo condiciones de alimentación ad libitum mostraron una mayor expresión de Slc2a4 y Hk2 comparado con el grupo cafetería; estos animales además presentaron una mayor reducción en los niveles de expresión de estos genes bajo condiciones de ayuno (p<0,05, efecto interactivo entre dieta y ayuno, ANOVA de dos factores). Asimismo, los animales control presentaron una reducción en los niveles de expresión de Pparg, Srebf1 y Cidea bajo condiciones de ayuno comparado a condiciones ad libitum, mientras que la expresión de estos genes no se vio afectada en los animales del grupo cafetería (o no de manera significativa en el caso de Pparg), por el ayuno. El grupo control en condiciones de alimentación ad libitum exhibieron una mayor expresión del ARNm de Fasn que animales del grupo cafetería (p<0,05, test de la t de Student), esta diferencia no se observó en condiciones de ayuno. Además, los niveles de expresión de este gen disminuyeron en los grupos en condición de ayuno, tanto en controles como en cafetería, sin embargo el porcentaje de esta reducción fue más pronunciado en el grupo control. Respecto al Insr, sólo los animales control, mostraron un incremento en los niveles de expresión de ARNm de este gen en condición de ayuno en comparación con la condición de alimentación ad libitum (p<0.05, test de la t de Student), por lo que los animales del grupo cafetería en condiciones de ayuno, tuvieron menores niveles de expresión de este gen respecto al grupo control (p<0,05, test de la t de Student).

Por otra parte, los animales alimentados con dieta de cafetería presentaron una menor expresión de Pnpla2 y una mayor expresión de Cpt1b que los controles (p<0,05, efecto dieta, ANOVA de dos factores).

Finalmente, como se refleja en los niveles de leptina circulante y en relación con la mayor cantidad de grasa corporal, los animales alimentados con dieta de cafetería presentaron una mayor expresión de leptina en el TAB que el grupo control (p<0,05, efecto dieta, ANOVA de dos factores); tanto el grupo control como cafetería disminuyeron la expresión de leptina en condiciones de ayuno (p<0,05, efecto ayuno, ANOVA de dos factores).

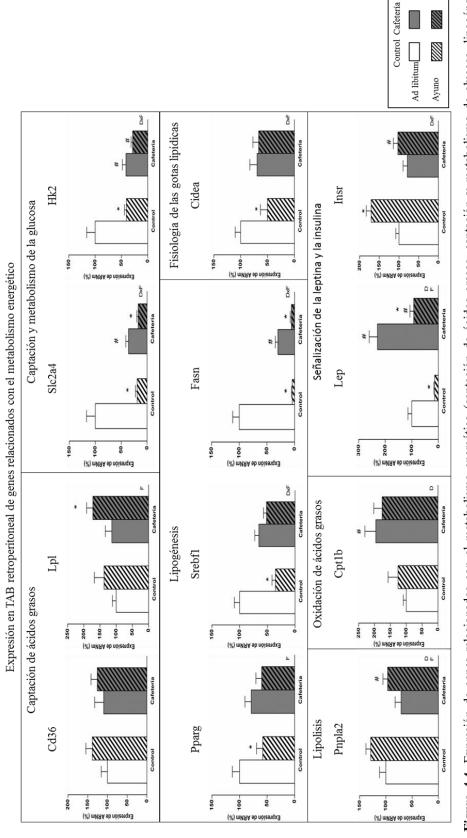


Figura 4.4. Expresión de genes relacionados con el metabolismo energético (captación de ácidos grasos, captación y metabolismo de glucosa, lipogénesis, Los datos son la media ± SEM (n=10-13). Los genes analizados fueron: Cd36, Lpl, Slc2a4, Hk2, Pparg, Srebfl, Fasn, Cidea, Pnpla2 Cpt1b, Lep e Insr: Estadística: ANOVA de dos factores). #, dieta de cafetería versus dieta control (p<0,05, test de la t de Student). *, condición de ayuno versus ad libitum (p<0,05, test de la t de fisiología de las gotas lipídicas, lipolisis, oxidación de ácidos grasos y señalización de la leptina y la insulina) en el TAB de ratas macho de 22 días de edad, F, efecto condición de alimentación (ad libitum/ayuno); D, Efecto dieta (control/cafetería); DxF, efecto interactivo entre dieta y condición de alimentación, (p<0,05, alimentados con una dieta control o con dieta de cafetería desde el día 10 de vida hasta su sacrificio bajo condiciones de alimentación ad libitum o ayuno de 12h. Student)

4.1.2. Discusión

Este estudio tenía como objetivo examinar la influencia de una exposición corta a una dieta de cafetería durante etapas tempranas en crías de ratas sobre la adaptación molecular a las condiciones de ayuno/alimentación en órganos clave para el metabolismo, con la finalidad de conocer los eventos moleculares que pueden condicionar los efectos más a largo plazo de este tipo de dieta. Con este propósito, crías macho de 10 días de edad fueron expuestas a una dieta de cafetería, edad aproximada en la que ocurre la transición natural de la dependencia de leche materna al consumo de alimentos sólidos (Oliver, Pico et al. 2002), y se analizó el estado metabólico al día 22 (después del destete) de estos animales bajo condiciones de alimentación y ayuno. Elegimos la dieta de cafetería debido a que se ha descrito como una herramienta interesante para inducir hiperfagia voluntaria y, por lo tanto, desarrollo de sobrepeso/obesidad en ratas; además refleja en gran medida el comportamiento de una dieta occidental en humanos (Pico, Pons et al. 1991; Akyol, McMullen et al. 2012; Oliver, Reynes et al. 2013). Curiosamente, en este estudio hemos observado una gran acumulación de grasa en ausencia de incremento de peso corporal, un efecto que no ha sido descrito anteriormente y que pudo haber pasado desapercibido, que además puede ser perjudicial particularmente en edades tempranas y de esta forma condicionar la salud metabólica en edades adultas.

La ingesta de la dieta de cafetería por un corto periodo de tiempo (12 días) en crías macho de 10 días de edad indujo hiperfagia y por lo tanto un exceso de calorías consumidas, de las cuales el 46% provenía de la grasa. La hiperfagia se acompañó de un marcado aumento de los depósitos de grasa corporal, tras este corto periodo, los animales cafetería tuvieron casi el doble de grasa corporal que las ratas control. La acumulación excesiva de grasa corporal durante etapas infantiles es motivo de especial preocupación, ya que un rápido crecimiento y una adiposidad temprana en humanos han sido propuestos como marcadores tempranos de obesidad en edad adulta (Brisbois, Farmer et al. 2012). Además, varios estudios en animales han mostrado que la exposición materna a "comida basura" o a una dieta de cafetería durante la gestación y la lactancia provoca una adiposidad irreversible en crías, incluso cuando estas crías son alimentadas con una dieta balanceada después del destete (Bayol, Simbi et al. 2005; Bayol, Simbi et al. 2008). Por otra parte, el comportamiento alimentario también se ve afectado por una exposición temprana a la "comida basura", favoreciendo el gusto por este tipo de alimentos (Bayol, Farrington et al. 2007), o produciendo cambios estructurales que afectan a los mecanismo de saciedad (Wright, Fone et al. 2011). Además de la hiperfagia observada en los animales alimentados con dieta de cafetería, la composición desequilibrada de la dieta (alta en grasa y baja en proteínas) también podría ser responsable en parte de los efectos observados en este estudio.

El eje hipotálamo-tejido adiposo contribuye de manera muy importante en el control de la ingesta de alimentos. La leptina juega un papel esencial en esta regulación, debido a que es secretada principalmente por el tejido adiposo en proporción a la cantidad de grasa almacenada y a través de su interacción con su receptor hipotalámico incrementa la expresión de neuropéptidos anorexigénicos e inhibe la expresión de neuropéptidos orexigénicos, particularmente el Npy (Schwartz, Woods et al. 2000). Los animales alimentados con dieta de cafetería presentaron niveles circulantes de leptina altos, reflejando el mayor tamaño de los depósitos de grasa corporal y una baja expresión hipotalámica de Npy (asociada con una elevada señalización de la leptina) comparados con los animales control. Sin embargo, la elevada ingesta calórica observada en estos

animales, está por encima de sus necesidades metabólicas, y representa una clara disfunción en el control de la ingesta y del balance energético. El fracaso de esta hiperleptinemia en producir alguna reducción compensatoria de la ingesta puede ser interpretada como una evidencia de la resistencia a la leptina (Morrison, Huypens et al. 2009). Además, en comparación con los animales control, los animales alimentados con dieta de cafetería mostraron una atenuada activación de la vía orexigénica, por ejemplo el ratio de los niveles de expresión de ARNm de Npy/Pomc, después de un ayuno de 12 horas, también indica una alteración en la respuesta a las condiciones de alimentación/ayuno.

Aunque los animales alimentados con dieta de cafetería no mostraron cambios en los niveles circulantes de insulina comparados con sus controles, parecen presentar otras alteraciones relacionadas con la señalización de la insulina a nivel periférico, particularmente en el TAB. La señalización de la insulina en el TAB favorece el almacenamiento lipídico al estimular la síntesis de triglicéridos e inhibir su degradación. Durante el ayuno, los niveles bajos de insulina ayudan a inhibir la lipogénesis e incrementar la lipolisis (Palou, Priego et al. 2008). Es de destacar, que en condiciones de ayuno, los animales alimentados con dieta de cafetería no disminuyeron la expresión de factores de transcripción relacionados con la lipogénesis, Pparg y Srebf1, a pesar de estar en una situación de demanda energética, lo que indicaría una alteración en la respuesta a las condiciones de ayuno/alimentación. Por otro lado, la reducida capacidad lipolítica encontrada en los animales alimentados con dieta de cafetería podría explicar la menor reducción del tamaño en los depósitos de grasa que muestran estos animales bajo condiciones de ayuno en comparación con los controles. La activación de la hidrolisis de los triglicéridos almacenados ocurre durante la inanición a través de la acción de lipasas (como la ATGL) y otros reguladores localizados en las gotas lipídicas. Por ejemplo, varias proteínas asociadas a los gotas lipídicas se conoce que están relacionadas con su la fisiología (Boren, Taskinen et al. 2013). Entre ellas, CIDEA se ha propuesto como regulador de la homeostasis energética (Zhou, Yon Toh et al. 2003). CIDEA se localiza en las gotas lipídicas y regula su agrandamiento, restringiendo así la lipolisis y favoreciendo el almacenamiento de lípidos. La expresión de CIDEA está controlada por PPARy. Agonistas del PPARy incrementan la expresión de Cidea, por lo que favorecen el almacenamiento de lípidos. Se ha observado que una depresión de CIDEA incrementa notablemente la lipolisis en adipocitos humanos (Puri, Ranjit et al. 2008). De hecho, ratones que carecen del gen que codifica para CIDEA presentan un fenotipo delgado, una lipolisis incrementada y resistencia a la obesidad inducida por la dieta y a la obesidad (Zhou, Yon Toh et al. 2003). En este estudio hemos, observado que el ayuno produce una reducción en la expresión de Cidea en animales control, lo que puede favorecer el incremento de la lipolisis, cosa que no ocurre en los animales alimentados con dieta de cafetería. Esta alteración en la respuesta a las condiciones alimentación, junto con los bajos niveles de expresión de ATGL (la principal lipasa implicada en la movilización de lípidos), que se encontró en los animales alimentados con dieta de cafetería comparado a los controles, sugiere que estos animales presentan una alteración para la movilización las reservas lipídicas. Estas alteraciones metabólicas en TAB de crías alimentadas con dieta de cafetería pueden contribuir a una gran acumulación de grasa y como se presentan a edades tempranas podrían tener más relevancia en el desarrollo de patologías relacionadas con la obesidad en edad adulta. Otras adaptaciones que ocurren en TAB de animales alimentados con dieta de cafetería, tales como la reducción de los niveles de expresión de Slc2a4, Hk2 y Fasn, así como el incremento de la expresión de Cpt1b, pueden ser interpretados como adaptaciones al mayor contenido de grasa de esta dieta en comparación con la dieta control.

La proteína quinasa activada por AMP (AMPK) es el principal sensor de energía en el interior de la célula (Hardie, Ross et al. 2012). Normalmente, AMPK detiene la síntesis y el almacenamiento de lípidos y promueve la oxidación de ácidos grasos para generar ATP (Hardie 2007; Canto and Auwerx 2010). La obesidad inducida por una dieta alta en grasas en ratas se ha asociado generalmente con una disminución de la actividad de la AMPK en múltiples tejidos (Lindholm, Ertel et al. 2013). No obstante, aquí hemos encontrado que los animales cafetería presentan en el hígado mayores niveles del ratio pAMPK/AMPK que las ratas control, bajo condiciones de ayuno y alimentación, lo cual sugiere una mayor activación de la vía de la AMPK. Estos resultados diferentes podrían explicarse por la diferencia en el periodo y la duración del dieta obesogénica, y por las alteraciones producidas en la sensibilidad a la leptina, la cual podría afectar a la relación leptina-AMPK. Se ha descrito que la leptina incrementa la vía de la AMPK tanto en músculo como en hígado (Minokoshi, Kim et al. 2002; Pico, Jilkova et al. 2011; Hasenour, Berglund et al. 2013). Por lo tanto, el incremento en los niveles de leptina en plasma junto con una mayor expresión del ARNm del receptor de leptina en hígado, como ocurre en los animales del grupo cafetería, podrían ser responsables del incremento de la activación de la vía de AMPK observada en estos animales, independientemente de la presencia de indicadores tempranos de resistencia a la leptina en otros tejidos, particularmente a nivel hipotalámico. La vía del metabolismo de los ácidos grasos es una de las mejor caracterizadas bajo la regulación de la vía de la AMPK (Yuan, Xiong et al. 2013). La AMPK puede inhibir la expresión de enzimas implicadas en la síntesis de ácidos grasos a nivel de transcripción, probablemente a través de la vía de regulación de SREBP1c (Li, Xu et al. 2011). De hecho, encontramos que los animales del grupo cafetería presentan una menor expresión de genes lipogénicos (Srebf1, Fasn y Scd1) bajo condiciones de alimentación ad libitum, comparados con los animales control, y una elevada expresión de genes relacionados con la oxidación de ácidos grasos (Ppara, Cpt1a y Pdk4). Los animales alimentados con una dieta de cafetería también presentaron un incremento en los niveles de expresión del receptor de insulina y altos niveles de proteína de InsR en hígado. Se sabe que la insulina regula directamente la expresión de Srebp1c (Foretz, Pacot et al. 1999). Por lo tanto, la menor activación de la expresión de Srebf1, y en consecuencia de sus dianas como Fasn y Scd1, bajo condiciones de alimentación que ocurre en los animales del grupo cafetería comparados con sus controles, aunque tengan una mayor abundancia de InsR, se podría interpretar como una fallo en la señalización de la insulina. Muchos estudios en animales jóvenes muestran que las dietas altas en grasa producen un rápido deterioro en la sensibilidad a la insulina (Revisado en (Morrison, Huypens et al. 2009)), lo cual podría favorecer la progresión de la resistencia a la insulina conduciendo al desarrollo de obesidad y diabetes. Sin embargo, si la señalización a la insulina en el hígado se encuentra alterada en nuestro modelo no está del todo claro, ya que no se encontraron alteraciones en los niveles de insulina plasmática o de AKT en hígado, implicada en la vía de la señalización a la insulina. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la exposición durante un periodo corto con dieta de cafetería en ratas jóvenes afecta el metabolismo hepático; el hígado sufre adaptaciones moleculares aparentemente dirigidas a mantener la homeostasis energética bajo este estrés dietético, principalmente se produce una disminución en la expresión de genes lipogénicos y el incremento en los niveles de expresión de genes relacionados con la oxidación de ácidos grasos, probablemente por activación de la vía leptina-AMPK.

4.1.3. Conclusiones

Hemos demostrado que, la introducción de una dieta de cafetería durante un periodo corto en etapas tempranas en ratas, es suficiente para alterar la respuesta metabólica a las condiciones de alimentación y ayuno en órganos clave del metabolismo energético, particularmente en TAB. Además existe una mayor hiperfagia y una gran acumulación de grasa corporal, a pesar de que no se observan diferencias importantes en el peso corporal.

4.2. Capítulo 2

En rata, la predisposición a la obesidad en la progenie causada por una dieta materna obesogénica es prevenible al normalizar la dieta antes del apareamiento

En este estudio se pretende analizar si los efectos perjudiciales presentes en las crías que se asocian con la obesidad materna pueden ser revertidos al eliminar la dieta obesogénica de las madres antes del apareamiento. Para ello ratas hembra fueron alimentadas con una dieta de cafetería desde el día 10 hasta el día 100 de vida, posteriormente cambiaron a una dieta estándar (madres postcafetería). En paralelo un grupo control de ratas hembra fue alimentado con una dieta estándar. Un mes después de eliminar la dieta de cafetería tanto las hembras del grupo control como de postcafetería fueron apareadas con machos controles. En el destete, crías macho y hembras de madres control y postcafetería fueron alimentadas con dieta estándar hasta los 4 meses de edad. Las ratas alimentadas con una dieta de cafetería presentaron mayor peso y grasa corporal que las controles. Al eliminar la dieta de cafetería se produjo una disminución en el peso y la grasa corporal, aunque permanecieron aumentados con un 8% y 13% de diferencia respectivamente en comparación con el grupo control en el momento del apareamiento. Durante el periodo de lactancia no se encontraron diferencias en el peso corporal entre los grupos; sin embargo las madres postcafetería presentaron mayor contenido de grasa corporal y de leptina en suero y leche. A partir de la semana 9 de vida, las crías de madres postcafetería presentaron menor peso corporal que los controles. A las 15 semanas de edad las crías de madres postcafetería no presentaron alteraciones en los parámetros bioquímicos analizados. Por tanto, eliminar la dieta de cafetería en ratas obesas un mes antes del apareamiento, aunque sin una completa reversión del exceso de peso corporal, puede prevenir los efectos perjudiciales asociados con la obesidad materna en las crías. Por otro lado, la mayor protección de las crías de madres postcafetería frente a la ganancia de peso corporal, puede estar relacionada con la mayor cantidad de ingesta de leptina durante el periodo de lactancia.

4.2.1. Resultados

Obtención del modelo de madres postcafetería.

Es sabido que la obesidad materna puede producir efectos negativos en la salud metabólica de la descendencia. También sabemos que la restricción calórica durante las primeras etapas de la gestación repercute de forma negativa en la descendencia. Por ello, aunque parezca razonable aconsejar una pérdida de peso en mujeres antes del embarazo, es necesario conocer y establecer los periodos en los que se produce esta pérdida de peso, para evitar efectos negativos en la descendencia. Por tanto, tal como se ha planteado en el objetivo 2 quisimos estudiar cuál es el efecto en ratas que se produce al quitar una dieta obesogénica y cambiarla por una dieta estándar, tratando de imitar lo que sería la intervención con una dieta equilibrada antes del embarazo.

Para ello primero, como se indica en la Tarea 2.1 dentro del objetivo 2, desarrollamos un modelo de obesidad inducida por dieta de cafetería (modelo postcafetería). Como ha sido descrito antes (Pico, Pons et al. 1991), la introducción de una dieta de cafetería en edades tempranas produce una obesidad irreversible en etapas adultas. Por esta razón expusimos a ratas hembra a una dieta de cafetería desde el día 10 hasta el día 100 de vida. Como se muestra en la Figura 4.5a las ratas alimentadas con una dieta de cafetería presentan un mayor peso corporal a partir del día 42 de vida en comparación con las ratas del grupo control (p<0,05, test de la t de Student), esta diferencia continua hasta el día 100. Al finalizar el periodo de exposición a la dieta de cafetería, los animales alimentados con dieta de cafetería presentaron un 30% más de peso corporal que las controles. A partir del día 100 de vida todos los animales fueron expuestos a una dieta control (periodo postcafetería). Durante el periodo postcafetería se observó una reducción del peso corporal de los animales alimentados previamente con dieta de cafetería, aunque siguieron manteniendo una diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control (p<0,05, test de la t de Student) hasta el día 130, cuando fueron apareadas con ratas macho control. En este punto (día 130), las ratas postcafetería presentaron un 8% de diferencia de peso corporal respecto al grupo control. Adicionalmente al peso corporal también se midió el porcentaje de masa grasa. Como se muestra en la Figura 4.5b, aunque no se observaron diferencias en el peso corporal hasta el día 42 de vida, ya en el destete las ratas alimentados con dieta de cafetería presentan un mayor contenido grasa corporal en comparación con las controles. Al día 100 (final del periodo de dieta de cafetería) los animales alimentados con dieta de cafetería presentaron un 24% más de grasa corporal que el grupo control (p<0,05, test de la t de Student). Después de 30 días del periodo postcafetería, aunque la diferencia en el porcentaje de grasa corporal disminuye, los animales postcafetería siguen presentando un 13% más de grasa corporal que el grupo control (p<0,05, test de la t de Student).

En total, 20 ratas control y 24 ratas postcafetería fueron apareadas con machos controles (día 130). Finalmente 9 hembras del grupo control y 12 hembras del grupo postcafetería quedaron embarazadas dentro de la primer semana de apareamiento y continuaron en nuestro estudio. Como se observa en la Figura 4.6 no hubo diferencias en el peso corporal durante el periodo de lactancia. Sin embargo el contenido de grasa corporal, que fue medido en los días 5, 10 y 15 de lactancia, fue mayor en las ratas del grupo postcafetería comparado con las controles (p<0,05, test de la t de Student) y el contenido de masa magra, menor. Se midió además la ingesta energética (Kcal) durante el periodo de lactancia, y se pudo observar que las madres control presentaron una ingesta mayor que las madres postcafetería (p<0,05, test de la t de Student).

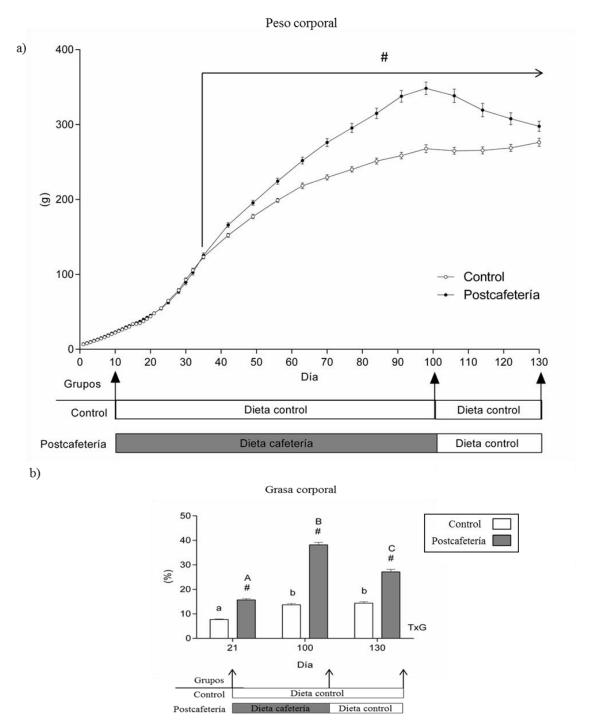


Figura 4.5. Obtención del modelo de madres postcafetería. a) Evolución del peso corporal del grupo control y del grupo postcafetería (ratas alimentadas con dieta de cafetería desde el día 10 hasta el día 100 de vida y con dieta control a partir de día 100). b) Porcentaje de grasa corporal de ratas del grupo control y del grupo postcafetería a los días 21, 100 y 130 de vida. Los datos son la media \pm SEM (n=20-24 animales por grupo). Estadística: TxG, efecto interactivo tiempo y grupo, ANOVA de medidas repetidas; para controles a \neq b, para postcafetería A \neq B \neq C (p<0,05, Bonferroni posthoc); #, postcafetería versus control (p<0,05, test de la t de Student).

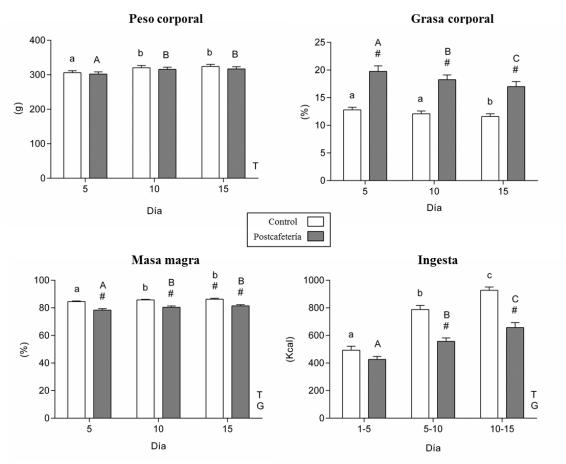


Figura 4.6. Peso, grasa corporal, masa magra e ingesta de ratas del grupo control y del grupo postcafetería registrados durante el periodo de lactancia a los días 5, 10 y 15. Los datos son la media \pm SEM (n=9-12 animales por grupo).). Estadística: T, efecto tiempo, G, efecto grupo y TxG, efecto interactivo tiempo y grupo, ANOVA de medidas repetidas; para controles a \neq b \neq c, para postcafetería A \neq B \neq C (p<0,05, Bonferroni posthoc); #, postcafetería versus control (p<0,05, test de la t de Student).

A continuación analizamos los efectos de la reversión de la dieta de cafetería antes del apareamiento en ratas hembra que presentan obesidad inducida por la dieta de cafetería (modelo postcafetería), en la composición de la leche materna, en particular en péptidos bioactivos relacionados con la regulación del balance energético y determinar el efecto sobre el peso y composición corporal en la descendencia (ver tarea 2.2).

En concreto analizamos los niveles de leptina, adiponectina e irisina en leche y suero de ratas control y ratas del grupo postcafetería a día 5, 10 y 15 de lactancia (Figura 4.7). Las madres del grupo postcafetería presentaron mayores niveles de leptina y adiponectina en leche durante la lactancia (p<0,05, efecto grupo, ANOVA de medidas Repetidas). Los niveles circulantes de adiponectina también fueron mayores en ratas del grupo postcafetería, comparado con las controles; sin embargo los de leptina sólo fueron mayores a día 5 de lactancia. Los niveles de irisina en leche descendieron a partir del día 5 de lactancia tanto en madres control como en madres del grupo postcafetería, sin embargo este descenso fue más pronunciado en madres del grupo postcafetería (p<0,05, efecto interactivo tiempo y grupo, ANOVA de medidas Repetidas). De hecho, las madres del grupo postcafetería presentaron menores niveles de irisina en leche que las controles tanto en día 10 como en día 15 (p<0,05, test de la t de Student). No hubo cambios significativos en los niveles circulantes de irisina. No se observaron diferencias en los niveles de triglicéridos y proteínas de la leche.

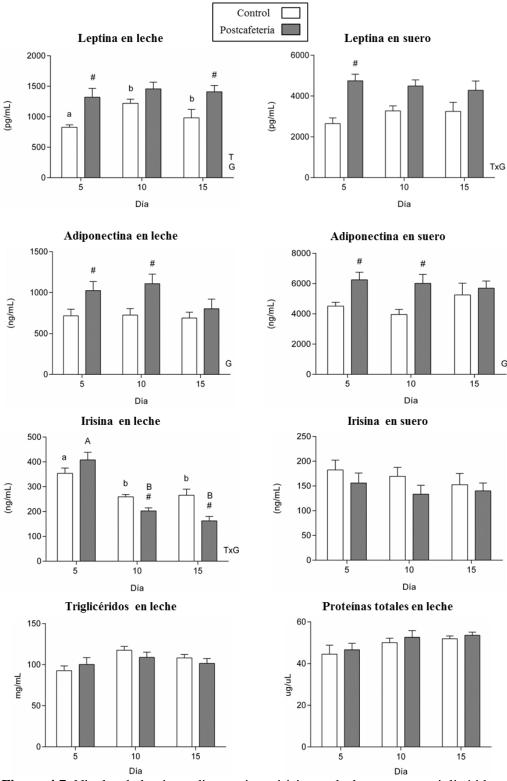


Figura 4.7. Niveles de leptina, adiponectina e irisina en leche y suero y triglicéridos y proteínas en leche de madres del grupo control y del grupo postcafetería registrados durante el periodo de lactancia a los días 5, 10 y 15. Los datos son la media ± SEM (n=10-12 animales por grupo). Estadística: T, efecto tiempo, G, efecto grupo y TxG, efecto interactivo tiempo y grupo, ANOVA de medidas repetidas; para controles a≠b, para postcafetería A≠B (p<0,05, Bonferroni posthoc); #, postcafetería versus control (p<0,05, test de la t de Student).

Efecto en el peso corporal de la descendencia.

Para determinar el efecto sobre el peso y composición corporal en la descendencia de la reversión de la dieta obesogénica antes del apareamiento (Tarea 2.2), estudiamos las crías de madres control y postcafetería. El día del nacimiento fue considerado día 0. Día 1 se igualaron todas las camadas a 10 crías por camada. Las crías de madres del grupo postcafetería presentaron un menor peso corporal ya desde el día 1 de vida (en el caso de las crías macho) y desde el día 2 en el caso de las crías hembra (p>0,05, test de la t de Student). La diferencia en el menor peso corporal se mantiene hasta el destete en las crías macho y hasta el día 11 en las crías hembra (ver Figura 4.8). En el destete no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de grasa corporal entre crías de madres control y crías de madres postcafetería (ver Figura 4.8).

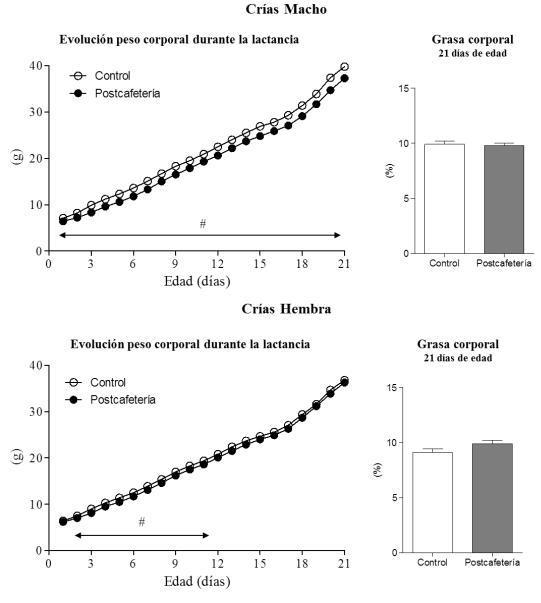
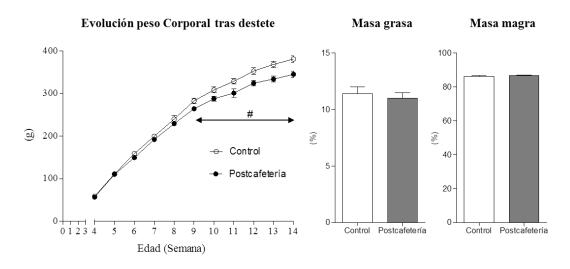


Figura 4.8. Peso corporal durante la lactancia y porcentaje de grasa corporal en el destete (21 días de edad) de crías de madres control y postcafetería. Los datos son la media ± SEM. Estadística: #, postcafetería versus control (p<0,05, test de la t de Student).

A partir del destete (21 días) las crías de madres control y postcafetería fueron estabuladas de dos en dos y alimentadas con una dieta control estándar. 1 semana

después del destete (4 semanas de edad) ya no hubo diferencias significativas en el peso corporal entre las crías macho de madres control y las crías de madres postcafetería (Figura 4.9). Sin embargo, más a largo plazo, las crías de madres postcafetería presentaron menor peso corporal en comparación con las crías de madres control. Esta diferencia fue estadísticamente significativa a partir de la semana 8 de edad en hembras y la semana 9 en machos (p<0,05, test de la t de Student). Se midió la composición corporal, y se observó que a las 14 semanas de edad no había cambios significativos ni el porcentaje de grasa corporal ni en el porcentaje de masa magra (Figura 4.9).

Crías Macho



Crías Hembra

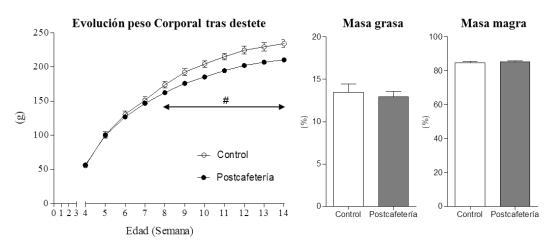


Figura 4.9. Peso corporal, porcentaje de grasa corporal y porcentaje de masa magra de crías de madres control y postcafetería de las 4 semanas de edad hasta la semana 14. Todos los grupos están expuestos a una dieta control. Los datos son la media \pm SEM (n=16-22). Estadística: #, postcafetería versus control (p<0,05, test de la t de Student).

A las 15 semanas, extrajimos una muestra de sangre de la vena safena en condiciones de alimentación *ad libitum* y ayuno de 12 h, para determinar parámetros bioquímicos y analizar su estado metabólico (Tabla 4.2). Las crías de madres del grupo postcafetería presentaron niveles circulantes de glucosa e insulina e índice HOMA similares a los del grupo control, tanto machos como hembras. En condiciones de alimentación *ad libitum*, las crías hembra de madres postcafetería mostraron una mayor leptinemia que sus

controles (p<0.05, test de la t de Student). En términos generales, la respuesta al ayuno fue similar en crías de madres control y postcafetería. Sin embargo, mientras que las crías macho del grupo control aumentan los niveles de NEFA circulantes en condiciones de ayuno, estos niveles están ya aumentados en las crías del grupo postcafetería (p<0,05, efecto interactivo ayuno y grupo, ANOVA de medidas repetidas).

Tabla 4.2. Parámetros circulantes de crías de madres del grupo control y del grupo postcafetería a las 15 semanas de edad en condiciones de alimentación *ad libitum* o ayuno de 12h.

		Machos			Hembras		
		Control	Postcafetería	ANOVA	Control	Postcafetería	ANOVA
Glucosa (mg/dL)	Ad libitum	153 ± 7	149 ± 4	A	126 ± 4	123 ±2	A
	Ayuno	105 ± 3*	105 ± 2*		97 ± 5*	94 ±2*	
Insulina (µg/L)	Ayuno	$0,\!30\pm0,\!02$	$0,027 \pm 0,01$		$0,25 \pm 0,01$	$0,26 \pm 0,01$	
HOMA	Ayuno	$1,91 \pm 0,17$	$1,71 \pm 0,07$		$1,44 \pm 0,08$	$1,42 \pm 0,07$	
Leptina (pg/mL)	Ad libitum	5811 ± 508	5161 ± 383	A	3133 ± 293	4133 ±317#	AxG
	Ayuno	1941 ± 211*	1932 ± 165*		1514 ± 207*	1111 ± 104*	
NEFAs (mM)	Ad libitum	$1,13 \pm 0,12$	1,69 ±0,14#	AxG	$1,43 \pm 0,19$	$1,44 \pm 0,15$	
	Ayuno	1,62 ± 0,12*	$1,60 \pm 0,1$		$1,31 \pm 0,10$	$1,67 \pm 0,11 \#$	

Estadística: # postcafetería vs control (p<0,05, test de la t de Student). *, Ayuno vs alimentación *ad libitum* (p<0,05, test para muestras pareadas). Los datos son la media ± SEM (n=16-22), A, efecto condición de alimentación (*ad libitum*/ayuno); GxF, efecto interactivo entre grupo y condición de alimentación, (p<0,05, ANOVA de medidas repetidas).

4.2.2. Discusión

Este estudio tenía como objetivo desarrollar un modelo de obesidad inducida por dieta de cafetería (modelo postcafetería), con la finalidad de analizar los efectos de la reversión de ésta dieta obesogénica en ratas hembra antes del apareamiento, en la composición de la leche materna, en particular de la leptina, péptido bioactivo relacionado con la regulación del balance energético y determinar el efecto sobre el peso y composición corporal en la descendencia. Con este propósito se expusieron ratas hembra a una dieta de cafetería desde el día 10 hasta el día 100 de vida, como se ha mencionado anteriormente, ya que la introducción de la dieta obesogénica en edades tempranas produce efectos más persistentes que si la dieta se introduce en la edad adulta (Pico, Pons et al. 1991; Proenza, Llado et al. 1992; Oliver, Reynes et al. 2013). La elección de este tipo de dieta se debe a que está es una herramienta importante para inducir hiperfagia voluntaria y en consecuencia producir el desarrollo de sobrepeso/obesidad en ratas; reflejando en gran medida el comportamiento alimenticio de la dieta occidental (Pico, Pons et al. 1991; Akyol, McMullen et al. 2012; Oliver, Reynes et al. 2013). Como era de esperar, las ratas alimentadas con dieta de cafetería presentaron un rápido incremento de peso en comparación con los animales control como resultado del elevado porcentaje en lípidos y carbohidratos que presenta la dieta de cafetería. Este aumento de peso corporal, se debe, en parte a la elevada acumulación de los depósitos de grasa, lo que confirma las propiedades obesogénicas de la dieta de cafetería, descritas anteriormente (Pico, Pons et al. 1991; Akyol, McMullen et al. 2012; Oliver, Reynes et al. 2013).

La obesidad y sus alteraciones metabólicas asociadas son los factores de riesgo que condicionan el estilo de vida y la salud en la población de los países desarrollados. Las enfermedades metabólicas que se generan como producto de la obesidad y el sobrepeso son la combinación de varios factores incluyendo, genéticos, fisiológicos y de influencia

ambiental (Vickers 2014). Una alteración en la condición de alimentación durante el embarazo por parte de la madre puede generar consecuencias metabólicas en etapas tardías, especialmente en el desarrollo de obesidad y resistencia a la insulina (Vickers, Gluckman et al. 2005). Se ha descrito que la obesidad durante el embarazo es un problema de salud importante debido a los riegos que se desarrollan tanto para la madre como para el recién nacido, entre los que se incluyen muerte fetal y diabetes gestacional (Catalano and Ehrenberg 2006). Existe evidencia epidemiológica derivada de estudios en animales que han demostrado que la obesidad materna genera consecuencias a largo plazo para las crías, propiciando el desarrollo de enfermedades metabólicas en edad adulta (Alfaradhi and Ozanne 2011); de acuerdo a lo anterior podemos observar que existen investigaciones enfocadas en el fenómeno de programación fetal, sin embargo no hay resultados que nos indiquen los efectos que puede generar la normalización de la dieta después de un periodo obesogénico en la composición corporal de las crías en etapas adultas; a nivel dietético podríamos considerar que el periodo de postcafetería de nuestro experimento es una forma de restricción calórica. Ha sido ampliamente discutido el hecho de que las restricciones energéticas antes del embarazo pueden afectar tanto la salud de la madre como del recién nacido, cuando dichas restricciones se realizan sin ninguna supervisión médica, debido a la deficiencia de micronutrientes como el calcio o el hierro indispensables para un buen desarrollo fetal (Ritchie and King 2000; Christian 2010; Pharoah, Buttfield et al. 2012; Black, Victora et al. 2013). Además, hay pocos estudios sobre el efecto que tienen las intervenciones dietéticas, con el fin de reducir el peso corporal materno antes de la gestación. Por ello, quisimos estudiar los efectos de la eliminación de la dieta de cafetería, antes del embarazo. Durante el periodo postcafetería, se pudo observar una disminución en el peso corporal de las ratas que previamente habían sido alimentadas con una dieta de cafetería. Esta disminución es en parte a una menor ingesta que se observa en estos animales, acompañado por el cambio de la composición de macronutrientes de la dieta, específicamente de lípidos, ya que mientras la dieta de cafetería contiene 46,3% de las calorías en forma de lípidos, la dieta control contiene solamente un 8% de calorías en forma de lípidos. El valor hedónico de los alimentos hace referencia a una ingesta controlada por sistemas neuronales (Berthoud 2011) y por señales homeostáticas que regulan el consumo, según la palatabilidad y sabor de los alimentos (Reid 1985; Levine and Billington 1997; Herz 1998). Al cambiar la dieta de cafetería (caracterizada por una amplia variedad de alimentos) por una dieta control hubo menor ingesta de alimentos en las ratas postcafetería, estudios en animales y en humanos han demostrado que una dieta con mayor variedad provoca un mayor consumo de alimentos (Raynor and Epstein 2001), el hecho de eliminar dicha variedad conduce a un cambio en la actividad de sensores de saciedad disminuyendo la ingesta de alimentos (Raynor, Niemeier et al. 2006). La menor ingesta de alimentos de las madres del grupo postcafetería comparado con las madres control, se mantuvo durante la gestación y hasta el final del periodo de lactancia.

A pesar de la menor ingesta que presentan las madres del grupo postcafetería con respecto a las controles, los efectos de la dieta de cafetería no llegan a ser completamente revertidos. Los niveles de grasa corporal de las ratas postcafetería, aunque se produzca una reducción de peso y grasa corporal después de consumir durante 30 días una dieta control, siguen siendo mayores que el grupo control. De hecho los niveles de grasa corporal siguen siendo mayores en las madres postcafetería hasta el final de la lactancia. En otro estudio en donde el periodo postcafetería se mantuvo durante 10 semanas tampoco se observó una reversión completa en el peso corporal (Rodriguez, Roca et al. 2003).

El periodo de lactancia representa una etapa de requerimientos energéticos importantes en donde las reservas de grasa desempeñan un papel importante en la regulación hormonal. Se caracteriza además por una movilización intensa de lípidos, en respuesta al aumento de procesos fisiológicos y metabólicos que mantienen un continuo flujo de energía para el mantenimiento de procesos vitales y para la síntesis de leche (Drackley 1999; Drackley JK 2005). Curiosamente, observamos que las madres postcafetería mantienen también durante la lactancia la diferencia en los niveles de grasa corporal en comparación con las madres control. De hecho también las madres del grupo postcafetería presenta niveles de leptina en suero, durante el periodo de lactancia más elevados que en las controles; considerando que la leptina es secretada principalmente por los adipocitos en proporción a la cantidad de tejido adiposo y que se ha relacionado con los niveles de adiposidad materno se correlaciona con los niveles de leptina en leche (Considine, Sinha et al. 1996; Savino and Liguori 2008; Savino, Liguori et al. 2010), se puede asumir que la hiperleptinemia observada en los animales postcafetería están positivamente correlacionada con el índice de masa corporal.

Esta mayor adiposidad materna se traduce en cambios en los niveles en leche materna de hormonas implicadas en la homeostasis energética, como son la leptina y la adiponectina, sin que haya cambios importantes en la concentración de macronutrientes (lípidos y proteínas). Sabemos que la leptina está también presente en la leche materna (Casabiell, Pineiro et al. 1997; Houseknecht, McGuire et al. 1997) y proviene del suero o por la producción por la glándula mamaria (Smith-Kirwin, O'Connor et al. 1998). Además, los niveles de leptina en leche humana son variables entre la población, existe una correlación positiva entre las concentraciones del leptina en leche y las concentraciones en plasma y la adiposidad (Houseknecht, McGuire et al. 1997; Uysal, Onal et al. 2002). De manera similar, los niveles de adiponectina en leche también se asocian positivamente con la adiposidad materna (Martin, Woo et al. 2006; Wang, Zhang et al. 2011). Con respecto a la irisina, en nuestro estudio, vemos como los niveles en leche materna parecen no depender del grado de adiposidad materno. Si bien, cabe destacar que hasta el momento sólo se ha descrito la presencia de irisina en leche materna en un único estudio (Aydin, Kuloglu et al. 2013) en el que se describe que la concentración de irisina en la leche es menor en mujeres lactantes con diabetes mellitus gestacional que en la leche de mujeres lactantes sanas (Aydin, Kuloglu et al. 2013), y no hay datos sobre su relación con la adiposidad materna. Por tanto, la mayor adiposidad que presentan las madres del grupo de postcafetería durante el periodo de lactancia se corresponde con niveles de leptina en leche más elevados en las madres postcafetería en comparación con las madres control.

Existen numerosas evidencias, tanto en humanos como en ratas, del papel de la leptina, como componente de la leche materna, en la futura prevención del desarrollo de obesidad en la edad adulta. En niños, los niveles de leptina en leche están negativamente correlacionados con el incremento de índice de masa corporal durante los primeros meses de vida (Doneray, Orbak et al. 2009; Schuster, Hechler et al. 2011) e incluso con la ganancia de peso corporal hasta los 2 años de edad (Miralles, Sanchez et al. 2006). En animales la suplementación con dosis fisiológicas de leptina durante la lactancia también tiene un efecto preventivo del desarrollo de obesidad y sobrepeso en etapas adultas (Pico, Oliver et al. 2007; Sanchez, Priego et al. 2008), tanto con una dieta normolipídica como con una dieta hiperlipídica. Además la suplementación con dosis fisiológicas de leptina se ha relacionado con efectos positivos previniendo la aparición de características metabólicas propias del síndrome metabólico: los animales suplementados con leptina oral durante la lactancia presenta, en la edad adulta, una

mayor sensibilidad a la insulina y a la leptina y una menor preferencia por los alimentos ricos en grasas (Sanchez, Priego et al. 2008). Por tanto, la diferente composición de péptidos bioactivos en la leche materna podría afectar a la programación metabólica en la descendencia.

Nuestros resultados muestran que las crías de madres postcafetería, tanto machos como hembras, tienen una menor ganancia de peso corporal en la edad adulta en comparación con las crías de madres control, sugiriendo que las crías de madres del grupo postcafetería presentan resistencia frente a la ganancia de peso. Además, no presentan alteraciones ni en el porcentaje de grasa corporal ni en los parámetros sanguíneos, tanto en condiciones de alimentación como en ayuno. No obstante, algunas investigaciones concluyen que el sobrepeso antes o durante la gestación condiciona a las crías de madres obesas al desarrollo de adiposidad y ganancia de peso (Revisado en (Lecoutre and Breton 2015)). Un modelo de obesidad inducida por dieta en ratones muestra que las crías tienen un aumento en la adiposidad después de tener un peso normal en el momento del nacimiento (Shankar, Harrell et al. 2008), también otros estudios en ratones y ovejas han demostrado que la obesidad materna genera adiposidad desde la etapa fetal (Muhlhausler and Smith 2009; Borengasser, Zhong et al. 2013) y en etapas adultas (Murabayashi, Sugiyama et al. 2013) lo que resulta en un aumento del tejido adiposo blanco. Sin embargo, cabe destacar que en dichas investigaciones no se ha incluido el periodo de postcafetería como una forma de normalización de la dieta antes del embarazo.

Por tanto, nuestro estudio parece indicar, que la eliminación de la dieta obesogénica antes del embarazo, sustituyéndola por una dieta control, baja en grasa, previene los efectos negativos de la obesidad materna en la descendencia. Cabe destacar, que en nuestro modelo experimental no hemos conseguido una completa normalización del peso ni del porcentaje de grasa corporal materno. Un factor fundamental, que puede participar de manera importante en la prevención de la ganancia de peso corporal de las crías de madres postcafetería, son los altos niveles de leptina que presentaron las madres postcafetería. Por tanto, las crías de madres postcafetería podrían haber estado expuestas a una mayor ingesta de leptina durante la lactancia, en comparación con las crías de madres control, y podría condicionar la prevención de la ganancia de peso corporal de las crías. La función de la leptina en el desarrollo y la programación metabólica puede implicar mecanismos a nivel central y periférico (Petrik, Reusens et al. 1999; Plagemann, Harder et al. 2000; Vickers, Reddy et al. 2001; Ozanne, Olsen et al. 2003) previniendo alteraciones en la composición corporal incluso después de exponerse a un ambiente obesogénico.

4.2.3. Conclusiones

La eliminación de la dieta de cafetería en ratas obesas antes de la gestación puede prevenir los efectos perjudiciales en las crías asociados con la obesidad materna, aunque no se consigue una reversión completa en el exceso de peso. Esta mayor protección de las crías de madres postcafetería frente al aumento de peso corporal y la acumulación de grasa en etapas adultas puede estar relacionada con una mayor ingesta de leptina durante el periodo de lactancia.

4.3. Capítulo 3

La normalización de la dieta antes de la gestación en ratas con obesidad inducida por la ingesta de una dieta de cafetería previene las alteraciones metabólicas en sus crías en etapas tempranas

En este estudio se pretende analizar si la reversión de la dieta obesogénica antes del apareamiento en ratas hembra, que presentan obesidad inducida por la dieta de cafetería (modelo postcafetería), puede prevenir y/o evitar los efectos perjudiciales de la obesidad materna en descendencia, más allá de los efectos fenotípicos (peso y grasa corporal) descritos en el capítulo 2. Para ello se analizó la expresión de genes en tejidos clave de la homeostasis energética y su adaptación metabólica a condiciones de alimentación y ayuno en edades tempranas. Con este fin, ratas hembra fueron alimentadas con una dieta de cafetería desde el día 10 hasta el día 100 de vida, posteriormente cambiaron a una dieta estándar (madres postcafetería). En paralelo un grupo control de ratas hembra fue alimentado con una dieta estándar. Un mes después de eliminar la dieta de cafetería tanto las hembras del grupo control como del grupo postcafetería fueron apareadas con ratas macho control. Las crías macho y hembra de madres control y postcafetería fueron sacrificados al día 26 en condiciones de alimentación ad libitum o tras 12 h de ayuno. Se analizó en el hígado, TAB retroperitoneal e hipotálamo la expresión de genes clave implicados en el metabolismo energético. El nivel de expresión en el hipotálamo de Ghsr, Lepr, Socs3, Stat3 y Pomc fue menor en las crías de madres postcafetería. Las crías macho, pero no las hembras, de madres postcafetería presentaron menor peso corporal que las crías de madres control, aunque no hubo diferencias en el contenido de grasa corporal. Las crías macho de madres postcafetería no mostraron diferencias en la expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico del hígado, además no se encontraron cambios en condición de ayuno en genes lipogénicos y lipolíticos en el TAB retroperitoneal y en el hígado. Sin embargo, las crías de madres postcafetería mostraron menor expresión de genes lipogénicos (Pparg, Srebf1 y Fasn) y lipolíticos (Pnpla2) tanto en condición de alimentación ad libitum como en ayuno en el TAB retroperitoneal comparado con las crías control. Las crías hembra de madres postcafetería presentaron una menor expresión hepática de genes implicados en la lipogénesis comparado con las hembras control, aunque la respuesta al ayuno no estaba alterada. Además, no se encontraron cambios en los niveles de expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico en el TAB retroperitoneal. Estos resultados sugieren que si se elimina la dieta de cafetería un mes antes de la gestación en madres con obesidad dietética, aunque sin llegar a producirse una reversión completa del exceso de peso corporal, aparentemente se pueden prevenir los efectos perjudiciales de la obesidad materna en el metabolismo lipídico de sus crías. Si bien, los cambios asociados al nivel de expresión génica en TAB retroperitoneal en las cría macho y los cambios asociados al nivel de expresión génica en el hígado de las hembras en estas etapas tempranas podrían condicionar su salud metabólica en edad adulta.

4.3.1. Resultados

Peso corporal y parámetros séricos

Este estudio tenía como objetivo analizar si el hecho de eliminar una dieta obesogénica de ratas alimentadas con una dieta de cafetería un mes antes de la gestación puede prevenir los efectos perjudiciales de la obesidad materna sobre la descendencia en la expresión de genes en tejidos clave de la homeostasis energética. Con este propósito ratas hembra fueron alimentadas con una dieta de cafetería desde el día 10 hasta el día 100 de vida, posteriormente cambiaron a una dieta estándar (madres postcafetería) durante un mes antes de ser apareadas con ratas macho control. Las crías fueron destetadas a día 21 y alimentadas con dieta estándar y sacrificadas a los 26 días bajo condiciones de alimentación *ad libitum* o ayuno de 12 h. Los resultados de peso y parámetros circulantes se muestran en la tabla 4.3.

A los 26 días de edad, las crías macho de madres postcafetería presentan un menor peso corporal que los machos de madres control (p<0,05, efecto grupo, ANOVA de dos factores); no se observaron cambios significativos en el peso corporal de las hembras. Después de un ayuno de 12 horas tanto las crías de madres postcafetería como las crías de madres control presentan un menor peso corporal comparado con los animales en condiciones de alimentación *ad libitum* (p<0,05, efecto condición de alimentación, ANOVA de dos factores). Ni en machos ni en hembras, se observaron diferencias significativas ni en el porcentaje de grasa corporal ni en los principales tejidos adiposos blancos (inguinal, mesentérico, retroperitoneal y epididimal), entre crías de madres postcafetería y crías de madres control. En crías machos de madres postcafetería se observó, en condiciones de alimentación *ad libitum*, un menor peso del hígado comparado con el grupo control (p<0,05, test de la t de Student).

Se midió la ingesta total de alimentos consumidos por las ratas sacrificadas en condiciones de alimentación *ad libitum*, y no se encontró diferencia significativa entre el grupo control y postcafetería (datos no mostrados).

En lo que concierne a los parámetros circulantes, no se observaron en machos diferencias significativas en los niveles circulantes de leptina entre las crías de madre control y madres postcafetería. No obstante, las crías hembra de madres postcafetería tuvieron mayores niveles de leptina comparadas con el grupo control, tanto en condiciones de alimentación *ad libitum* como en ayuno (p<0,05, efecto grupo, ANOVA de dos factores). Los niveles de glucosa en las crías macho de madres postcafetería en condición de alimentación *ad libitum* son mayores que en las crías de madres control (p<0,05, test de la t de Student). Tanto las crías macho como las hembras de madres del grupo postcafetería, presentaron niveles similares de NEFAs a las crías de madres control y la respuesta al ayuno fue similar en ambos grupos.

Tabla 4.3. Peso, porcentaje de grasa corporal, peso de los diferentes depósitos de tejido adiposo blanco (TAB) e hígado, y niveles circulantes de glucosa, leptina y ácidos grasos libres de crías macho y hembra de 26 días de edad de madres control y postcafetería, sacrificadas en condiciones de alimentación *ad libitum* o tras 12 h de ayuno.

		Machos			Hembras		
		Control	Postcafetería	ANOVA	Control	Postcafetería	ANOVA
Peso corporal (g)	Ad libitum	$65,5 \pm 1,7$	55,2 ± 1,6#	G, A	56,7 ± 2,1	56,3 ± 1,6	A
	Ayuno	52,6 ± 1,1*	48,9 ± 1,5*		46,8 ± 2,2*	47,6 ± 1,4*	
Grasa corporal (%)	Ad libitum	$9,9 \pm 0,3$	$9,8 \pm 0,2$		$9,1 \pm 0,4$	$9,9 \pm 0,3$	A
	Ayuno	6,3 ± 0,3*	7,0 ± 0,3*	A	6,7 ± 0,4*	6,5 ± 0,3*	
T.D	Ad libitum	671 ± 31	614 ± 33	A	640 ± 74	590 ± 32	- A
TAB inguinal (mg)	Ayuno	549 ± 33*	553 ± 34		534 ± 52	528 ± 31	
TAB mesentérico	Ad libitum	339 ± 27	305 ± 11	A	306 ± 23	289 ± 22	
(mg)	Ayuno	240 ± 16*	244 ± 16*		224 ± 16*	236 ± 15*	
TAB	Ad libitum	127 ± 11	110 ± 9	A	91 ± 9	95 ± 7	A
retroperitoneal (mg)	Ayuno	93 ± 6*	104 ± 10		65 ± 8*	69 ± 6*	
TAD	Ad libitum	132 ± 13	140 ± 23	A	103 ± 10	110 ± 16	A
TAB gonadal (mg)	Ayuno	93± 8*	0100 ± 10		74 ± 10*	76 ± 6*	
II/	Ad libitum	$2,74 \pm 0,09$	2,29 ± 0,08#	GxA	$2,20 \pm 0,17$	$2,31 \pm 0,13$	A
Hígado (g)	Ayuno	1,83 ± 0,04*	1,70 ± 0,06*		1,46 ± 0,11*	1,58 ± 0,06*	
CI ((III.)	Ad libitum	153±3	164 ± 5#	A	149 ± 3	150 ± 4	A
Glucosa (mg/dL)	Ayuno	90 ± 5*	87 ± 5*		94 ± 3*	93 ± 4*	
Lanting (ng/mL)	Ad libitum	1807 ± 164	1690 ± 110	A	1314 ± 112	1736 ± 128#	G, A
Leptina (pg/mL)	Ayuno	214 ± 22*	264 ± 60*		211 ± 34*	350 ± 33*#	
NIELEA - (M)	Ad libitum	$0,95 \pm 0,21$	$1,20 \pm 0,24$	A	0.89 ± 0.09	$1,05 \pm 0,14$	A
NEFAs (mM)	Ayuno	1,75 ± 0,13*	2,07 ± 0,22*		2,29 ± 0,20*	1,81 ± 0,19*	

Abreviaturas: NEFAs, ácidos grasos libres no esterificados; TAB, tejido adiposo blanco;

Estadística: # Postcafetería vs control (p<0,05, test de la t de Student). *, Ayuno vs alimentación *ad libitum* (p<0,05, test de la t de Student). Los datos son la media ± SEM (n=11-17), G, efecto grupo (control/postcafetería); A, efecto condición de alimentación (*ad libitum*/ayuno); GxA, efecto interactivo entre grupo y condición de alimentación, (p<0,05, ANOVA de dos factores).

Expresión de genes relacionados con el balance energético en el hipotálamo

Los niveles de expresión de ARNm del Lepr, Ghsr, Socs3, Stat3, Npy y Pomc en el hipotálamo de crías de madres control o postcafetería se muestran en las Figuras 4.10 (crías macho) y 4.11 (crías hembra).

El nivel de expresión del ARNm de Ghsr, Lepr, Socs3 y Stat3 fue menor en las crías de madres postcafetería en comparación con las crías de madres control, tanto en machos como en hembras (p<0,05, efecto grupo, ANOVA de dos factores). En las crías macho de madres postcafetería se observaron también menores niveles del ARNm del Npy y Pomc (p<0,05, efecto grupo, ANOVA de dos factores). Las crías hembra de madres postcafetería presentaron menores niveles del ARNm de Npy en condiciones de alimentación *ad libitum* pero no en ayunas, comparado con las crías de madres del grupo control (p<0,05, efecto interactivo, ANOVA de dos factores).

En rasgos generales el ayuno no produjo efectos significativos en la expresión de estos genes, exceptuando en crías macho, cuya expresión de Socs3 y Pomc fue menor en los grupos de la condición ayuno comparado con los grupos sacrificados en condición de alimentación *ad libitum* (p<0,05, efecto ayuno, ANOVA de dos factores). Cabe destacar que este efecto fue especialmente más marcado en las crías macho del grupo control que en las crías postcafetería (p<0,05, test de la t de Student).

Expresión hipotalámica de genes relacionados con el metabolismo energético en crías macho

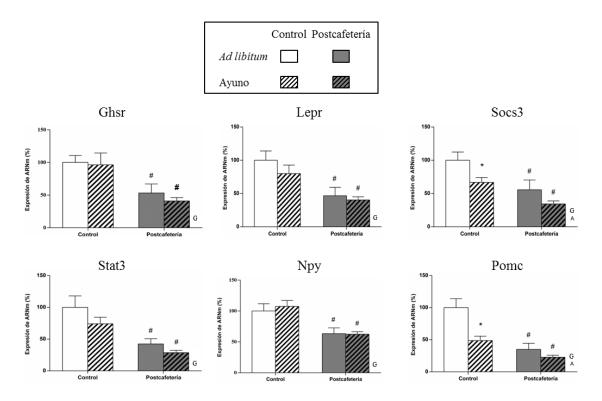


Figura 4.10. Expresión de genes relacionados con el metabolismo energético en el hipotálamo de ratas macho madres control o de madres del grupo postcafetería. Las crías se destetaron a día 21 y fueron alimentadas con dieta control hasta su sacrificio (día 26) bajo condiciones de alimentación *ad libitum* o ayuno de 12h. Los datos son la media ± SEM (Control: *ad libitum*=12, ayuno=11; Postcafetería: *ad libitum*=16, ayuno=17). Los genes analizados fueron: Ghsr, Lepr, Socs3, Stat3, Npy y Pomc. Estadística: G, efecto grupo (control/postcafetería); A, efecto condición de alimentación (*ad libitum*/ayuno); GxA, efecto interactivo entre grupo y condición de alimentación, (p<0,05, ANOVA de dos factores). # Postcafetería vs control (p<0,05, test de la t de Student). *, Ayuno vs alimentación *ad libitum* (p<0,05, test de la t de Student).

Expresión hipotalámica de genes relacionados con el metabolismo energético en crías hembra

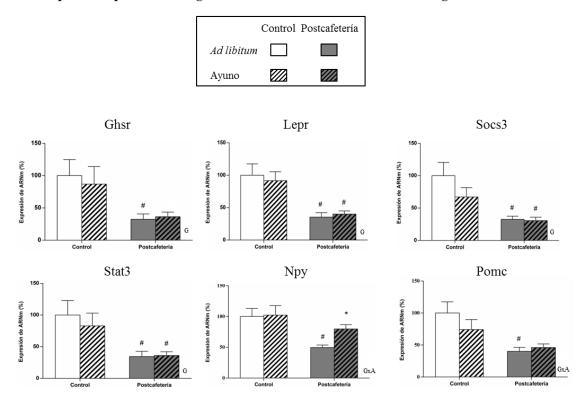


Figura 4.11. Expresión de genes relacionados con el metabolismo energético en el hipotálamo de ratas hembra de madres control o de madres del grupo postcafetería. Las crías se destetaron a día 21 y fueron alimentadas con dieta control hasta su sacrificio (día 26) bajo condiciones de alimentación *ad libitum* o ayuno de 12h. Los datos son la media ± SEM (Control: *ad libitum*=13, ayuno=14; Postcafetería: *ad libitum*=16, ayuno=17). Los genes analizados fueron: Ghsr, Lepr, Socs3, Stat3, Npy y Pomc. Estadística: G, efecto grupo (control/postcafetería); A, efecto condición de alimentación (*ad libitum*/ayuno); GxA, efecto interactivo entre grupo y condición de alimentación, (p<0,05, ANOVA de dos factores). # Postcafetería vs control (p<0,05, test de la t de Student). *, Ayuno vs alimentación *ad libitum* (p<0,05, test de la t de Student).

Expresión de genes relacionados con el metabolismo energético en el hígado

Los resultados que muestran la expresión de genes que participan en la utilización y metabolismo de los nutrientes en el hígado se muestran en las Figuras 4.12 (crías macho) y 4.13 (crías hembra).

En rasgos generales, las crías, tanto macho como hembras, de madres postcafetería no muestran alteraciones en la expresión hepática de los genes estudiados implicados en la captación y oxidación de ácidos grasos, metabolismo de la glucosa y señalización de la leptina e insulina, comparados con las crías de madres control y la respuesta al ayuno fue similar. Si bien, cabe destacar que aunque las crías macho de madres postcafetería no presentan alteraciones, en la expresión hepática de genes relacionados con la lipogénesis, las crías hembras presentan, en condiciones de alimentación *ad libitum* menores niveles de expresión de los genes lipogénicos estudiados.

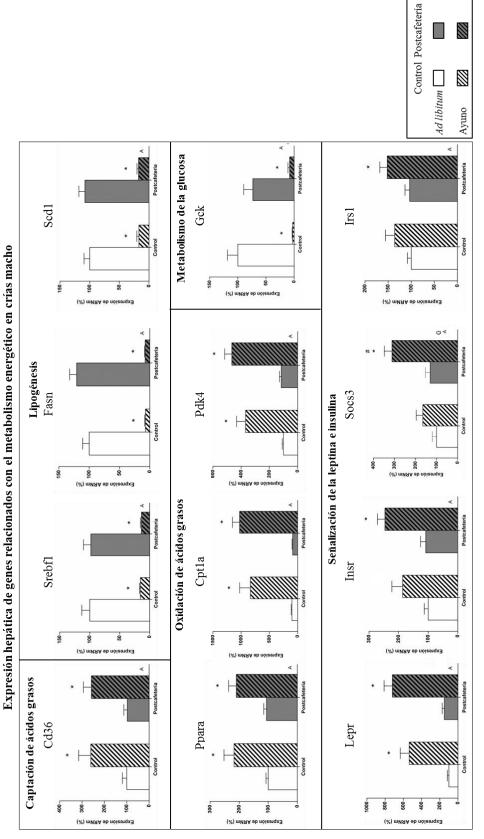
Específicamente, en machos no se encontraron diferencias en los niveles de ARNm para Cd36 entre crías de madres control y crías de madres postcafetería. Cabe destacar que así como los machos en condición de ayuno mostraron un aumento en la expresión de este gen, tanto en el grupo control como postcafetería (p<0,05, test de la t de Student), en las crías hembra de madres control se observó una disminución en la expresión en comparación con el grupo *ad libitum* (p<0,05, test de la t de Student) y no hubo cambios en las crías hembra de madres postcafetería.

En machos los niveles de expresión de genes lipogénicos (Srebf1, Fasn y Scd1) fue similar entre crías de madres control y crías de madres postcafetería, y menor en el grupo ayuno comparados con el grupo en condición de alimentación *ad libitum* tanto en el grupo control como postcafetería (p<0,05, efecto condición de alimentación, ANOVA de dos factores). Sin embargo, las crías hembra de madres postcafetería en condición de alimentación *ad libitum* presentan una menor expresión de estos genes en comparación con el grupo control (p<0,05, test de la t de Student).

Tanto las crías macho como las crías hembra de madres postcafetería presentan niveles similares de expresión de ARNm en genes relacionados con la oxidación de ácidos grasos (Cpt1a y Pdk4), y se produce un aumento en la expresión de estos genes en animales en ayuno comparados con las ratas en condición de alimentación *ad libitum* tanto en el grupo control como postcafetería (p<0,05, efecto condición de alimentación, ANOVA de dos factores). En machos, la expresión de Ppara sigue un patrón similar al descrito para la Cpt1a y Pdk4, sin embargo, la expresión de Ppara fue significativamente menor en las crías hembra del grupo postcafetería en condición de alimentación *ad libitum* comparado con las controles (p<0,05, efecto tratamiento, ANOVA de dos factores), y no presentaron cambios en la expresión de este gen por efecto del ayuno.

Además, en crías macho y crías hembra se observó una menor expresión de ARNm para la glucoquinasa en condición de ayuno tanto en animales control como postcafetería (p<0,05, efecto condición de alimentación, ANOVA de dos factores).

En genes que participan en la señalización de la leptina y la insulina, no se observaron cambios en los niveles de expresión de ARNm de Lepr, Insr, Socs3 e Irs1 entre crías de madres postcafetería y crías de madres controles. En crías macho, se produce un aumento en la expresión de estos genes en respuesta al ayuno tanto en el grupo control como postcafetería (p<0,05, efecto condición de alimentación, ANOVA de dos factores). En las hembras, con el ayuno se observa un incremento en la expresión de Lepr, en crías control y crías postcafetería, y una reducción en la expresión de ARNm para Socs3 (p<0,05, efecto condición de alimentación, ANOVA de dos factores).



ayuno=17). Los genes analizados fueron: Cd36, Srebfl, Fasn, Scd1, Ppara, Cpt1a, Pdk4, Gck, Lepr, Insr, Socs3e Irs1. Estadistica: G, efecto grupo (control/postcafeteria); A, efecto condición de alimentación (ad libitum/ayuno), (p<0,05, ANOVA de dos factores). # Postcafeteria vs control (p<0,05, test de la t de Student). *, Ayuno vs alimentación ad libitum Figura 4.12. Expresión de genes relacionados con el metabolismo energético (captación de ácidos grasos, lipogénesis, oxidación de ácidos grasos, metabolismo de la glucosa y señalización de la leptina y la insulina) en hígado de crias macho de madres control o postcafetería. Las crias se destetaron a día 21 y fueron alimentadas con dieta control hasta su sacrificio (día 26) bajo condiciones de alimentación ad libitum o ayuno de 12h. Los datos son la media ± SEM (Control: ad libitum=12, ayuno=11; Postcafetería: ad libitum=16, (p<0,05, test de la t de Student).

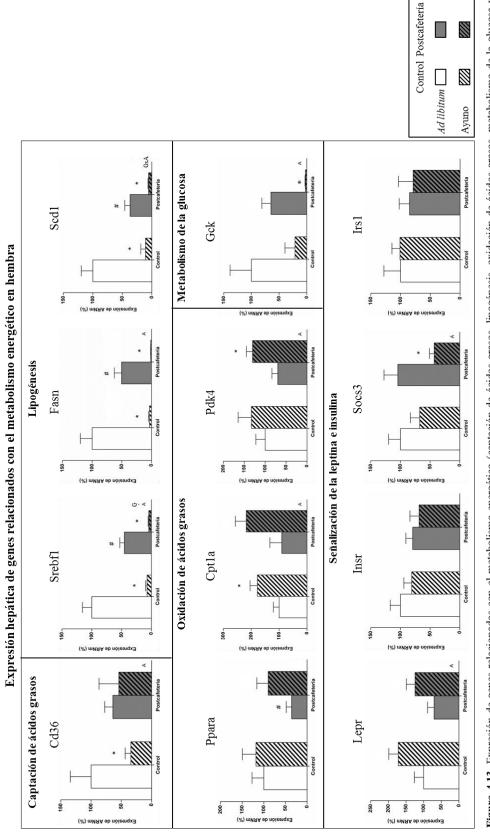


Figura 4.13. Expresión de genes relacionados con el metabolismo energético (captación de ácidos grasos, lipogénesis, oxidación de ácidos grasos, metabolismo de la glucosa y señalización de la leptina y la insulina) en hígado de crías hembra de madres control o postcafetería. Las crías se destetaron a día 21 y fueron alimentadas con dieta control hasta su sacrificio (día 26) bajo condiciones de alimentación ad libitum o ayuno de 12h. Los datos son la media ± SEM (Control: ad libitum=13, ayuno=14; Postcafetería: ad libitum=16, ayuno=17). Los genes analizados fueron: Cd36, Srebfl, Fasn, Scd1, Ppara, Cpt1a, Pdk4, Gck, Lepr, Insr., Socs3 e Irs1. Estadística: G, efecto grupo (control/postcafeteria); A, efecto condición de alimentación (ad libitum/ayuno), (p<0,05, ANOVA de dos factores). # Postcafetería vs control (p<0,05, test de la t de Student). *, Ayuno vs alimentación ad libitum (p<0,05, test de la t de Student).

Expresión de genes relacionados con el metabolismo energético en tejido adiposo blanco retroperitoneal

El depósito retroperitoneal fue elegido como representativo del TAB debido a su relación con el desarrollo de la resistencia a la insulina y diabetes tipo 2 (Gabriely, Ma et al. 2002). Los resultados que muestran la expresión de genes relacionados con la utilización y metabolismo de nutrientes en este tejido adiposo se presentan en las Figuras 4.14 (crías macho) y 4.15 (crías hembra).

Las ratas en condición de ayuno presentan mayores niveles de ARNm de genes relacionados con la captación de ácidos grasos (Cd36 y Lpl) comparado con las ratas en condición de alimentación *ad libitum* tanto en el grupo control como postcafetería; esta diferencia se presentó tanto en machos como en hembras, aunque en machos fue sólo estadísticamente significativa en el grupo control (p<0,05, test de la t de Student).

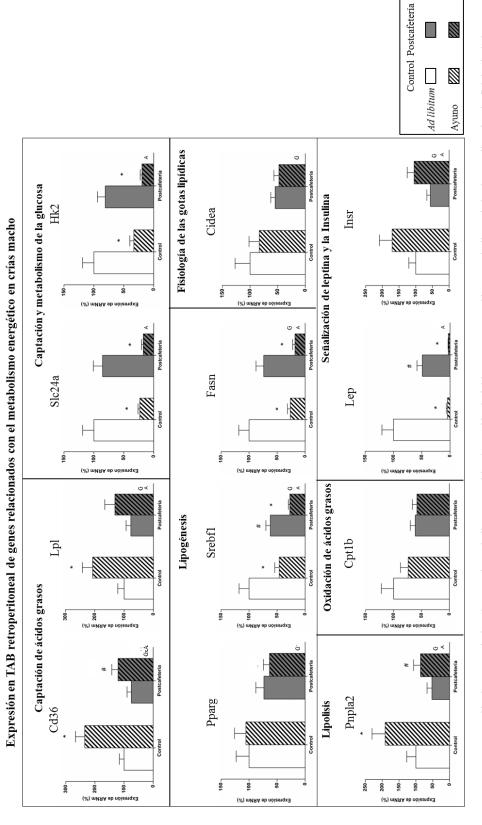
No se observaron diferencias en los niveles de expresión de genes relacionados con la captación y metabolismo de la glucosa (Slc24a y Hk2) entre las crías del grupo control y postcafetería. En crías macho hubo una menor expresión de ARNm en los grupos en condición de ayuno tanto en los animales control como postcafetería (p<0,05, efecto condición de alimentación, ANOVA de dos factores)

En genes relacionados con la lipogénesis (Pparg, Srebf1c y Fasn) y en el Cidea (que participa en la fisiología de las gotas lipídicas) se observó una menor expresión en los niveles de ARNm en crías macho de madres postcafetería comparado con las controles (p<0,05, efecto grupo, ANOVA de dos factores), pero no se encontró esta diferencia en el grupo de las hembras. Con el ayuno, disminuyó la expresión de ARNm de Srebf1 y Fasn en crías macho y hembra de madres control, pero sólo en crías macho de madres postcafetería (p<0,05, test de la t de Student). Los niveles de ARNm de Pparg aumentaron con el ayuno sólo en crías hembra de madres postcafetería (p<0,05, test de la t de Student).

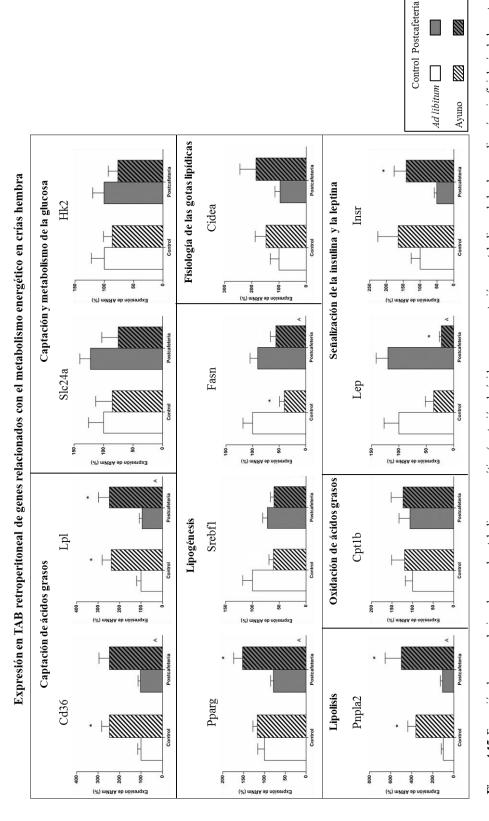
En relación con la lipolisis, la expresión de ARNm para Pnpla2 fue menor en crías macho de madres postcafetería comparados con las crías del grupo control (p<0,05, efecto grupo, ANOVA de dos factores), mientras que en las hembras no se observó dicho efecto; en condición de ayuno hubo una mayor expresión (p<0,05, efecto condición de alimentación, ANOVA de dos factores), en crías macho y hembra, aunque en machos este aumento fue sólo significativo en crías de madres control (p<0,05, test de la t de Student).

No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión para Cpt1b, ni en machos ni en hembras.

Los niveles de expresión de leptina y del Insr fueron menores en machos del grupo postcafetería en comparación con los controles (p<0,05, efecto grupo, ANOVA de dos factores); esta menor expresión no se observó en hembras. Tanto en machos como en hembras, en el ayuno los niveles de expresión de leptina fueron menores tanto en crías del grupo control como crías de madres postcafetería (p<0,05, efecto condición de alimentación, ANOVA de dos factores). Por otra parte, bajo condición de ayuno los niveles de expresión de Insr fueron más elevados tanto en el grupo control como postcafetería (p<0,05, test de la t de Student).



lipídicas, lipólisis, oxidación de ácidos grasos y señalización de la leptina y la insulina) en tejido adiposo blanco (TAB) de crías macho de madres control o postcafetería. Las crías Figura 4.14. Expresión de genes relacionados con el metabolismo energético (captación de ácidos grasos, captación y metabolismo de la glucosa, lipogénesis, fisiología de las gotas se destetaron a día 21 y fueron alimentadas con dieta control hasta su sacrificio (día 26) bajo condiciones de alimentación ad libitum o ayuno de 12h. Los datos son la media ± SEM (Control: ad libitum=12, ayuno=11; Postcafetería: ad libitum=16, ayuno=17). Los genes analizados fueron: Cd36, Lpl, Slc24a, Hk2, Pparg, Srebfl, Fasn, Cidea, Pnpla2, Cpt1b, Lep e Insr. Estadística: G, efecto grupo (control/postcafeteria); A, efecto condición de alimentación (ad libitum/ayuno); GxA, efecto interactivo entre grupo y condición de alimentación, (p<0,05, ANOVA de dos factores). # Postcafetería vs control (p<0,05, test de la t de Student). *, Ayuno vs alimentación ad libitum (p<0,05, test de la t de Student).



Lep e Insr. Estadística: G, efecto grupo (control/postcafetería); A, efecto condición de alimentación (ad libitum/ayuno); GxA, efecto interactivo entre grupo y condición de Figura 4.15. Expresión de genes relacionados con el metabolismo energético (captación de ácidos grasos, captación y metabolismo de la glucosa, lipogénesis, fisiología de las gotas lipídicas, lipólisis, oxidación de ácidos grasos y señalización de la leptina y la insulina) en tejido adiposo blanco (TAB) de crias hembra de madres control o postcafetería. Las crias se destetaron a día 21 y fueron alimentadas con dieta control hasta su sacrifício (día 26) bajo condiciones de alimentación ad libitum o ayuno de 12h. Los datos son la media ± SEM (Control: ad libitum =13, ayuno=14; Postcafeteria: ad libitum =16, ayuno=17). Los genes analizados fueron: Cd36, Lpl, Slc24a, Hk2, Pparg, Srebfl, Fasn, Cidea, Propla2 Cptlb, alimentación, (p<0.05, ANOVA de dos factores). # Postcafetería vs control (p<0.05, test de la t de Student). *, Ayuno vs alimentación ad libitum (p<0.05, test de la t de Student).

4.3.2 Discusión

Como se ha comentado en el capítulo anterior, las crías de madres postcafetería presentaron durante la lactancia un menor peso corporal que las crías de madres control que se mantuvo hasta el destete en los machos y hasta día 11 en las hembras (Ver Figura 4.8 en capítulo 2). Más allá de las diferencias en peso corporal, quisimos ver si la reversión de la dieta obesogénica un mes antes de la gestación, prevenía los efectos metabólicos adversos en las adaptaciones metabólicas a los ciclos de alimentación/ayuno en tejidos clave implicados en la homeostasis energética. Como hemos visto en el capítulo 1, un corto periodo de dieta obesogénica durante etapas iniciales es capaz de alterar la respuesta metabólica en tejidos clave. Para ello, estudiamos la respuesta a la alimentación/ayuno en crías de madres del modelo postcafetería, comparado con las crías control a una edad temprana, 26 días de edad, 5 días tras el destete.

El hipotálamo integra una serie de señales periféricas que actúan sobre el mantenimiento de la homeostasis energética (Coll and Yeo 2013), a través de la regulación de la ingesta energética (Schneeberger, Gomis et al. 2014). Como hemos mencionado anteriormente, la leptina juega un papel importante en dicha regulación debido a que es secretada principalmente por el tejido adiposo en correlación con la cantidad de grasa almacenada interactuando con su receptor en el hipotálamo, y de esta forma incrementa la expresión de neuropéptidos anorexigénicos como Pomc e inhibe la actividad de neuropéptidos orexigénicos, principalmente de NPY (Schwartz, Woods et al. 2000). La leptina circulante disminuye con el ayuno, atenuándose por tanto sus efectos anorexigénicos, y aumento con la realimentación (Pico, Sanchez et al. 2002; Palou, Sanchez et al. 2009). De hecho, se ha propuesto que la función primaria de la leptina sería la señalización del estado nutricional en una situación de ayuno (Ahima and Flier 2000). Los resultados de nuestro estudio indican que las crías, tanto macho de madres postcafetería, responden a las condiciones alimentación/ayuno de igual forma que las ratas cuyas madres han tenido dieta control. En el capítulo 1, se ha descrito que la ingesta de una dieta de cafetería durante las etapas tempranas produce una disfunción en el control de la ingesta y del balance energético, evidenciado por una alteración en la expresión del Npy a las condiciones de alimentación/ayuno. En este caso, los cambios en los niveles de expresión del principal neuropéptido orexigénico (Npy) y el principal neuropéptido anorexigénico (Pomc) y de otros genes relacionados con la señalización de la leptina y la grhelina (Ghsr, Socs3, Stat3), en respuesta a la condición de alimentación ad libitum o ayuno son similares en crías de madres postcafetería y control lo que sugiere que no existe alteración alguna en el control de la ingesta energética a nivel hipotalámico. De hecho, no existen diferencias en la ingesta entre ambos grupos. Sin embargo es importante mencionar que los niveles de expresión de estos dos neuropéptidos y de Ghsr, Socs3, Stat3 son menores en el grupo postcafetería en comparación con el grupo control. Esto sucede tanto en crías macho como en crías hembras, y probablemente pudiera condicionar el estado metabólico de estas crías en etapas adultas frente a un ambiente obesogénico. En machos, esos menores niveles no se pueden explicar por diferencias en los niveles circulantes de leptina, ya que no se observó diferencia alguna en los niveles de leptina entre las crías control y postcafetería. En las hembras las crías de madres postcafetería presentan niveles de leptina circulantes mayores, que sí podrían explicar la menor expresión de Npy pero no de Pomc. Aunque no se ha medido directamente esta disminución generalizado en los niveles de expresión de neuropéptidos y otros genes hipotalámicos podría estar relacionado con una disminución en el número total de

neuronas. Cambios estructurales permanentes en órganos claves pueden ser un posible mecanismo por el cual la nutrición materna puede afectar a la programación metabólica de la descendencia. Por tanto, cambios permanentes producidos en el hipotálamo durante los períodos críticos del desarrollo podrían explicar la capacidad deteriorada para regular la homeostasis de la energía en la edad adulta. La alteración de la organización neuronal en el hipotálamo ya sea a través de restricción de nutrientes, o a través de la señalización hormonal alterada en la vida fetal puede ser un importante mecanismo de programación nutricional subyacente (Remmers and Delemarre-van de Waal 2011). Existen varios ejemplos en modelos animales que muestran cómo el entorno perinatal supone efectos duraderos en el desarrollo del cerebro (Plagemann, Harder et al. 2000; Garcia, Palou et al. 2010). Se ha descrito que en modelos animales propensos a obesidad existen modificaciones en las estructuras hipotalámicas, particularmente una reducción del número de células en el núcleo arqueado. Estos efectos se han observado en la descendencia de madres alimentadas con dietas hipoproteicas o con restricción calórica durante la gestación, y se han relacionado con efectos perjudiciales en la edad adulta (Plagemann, Harder et al. 2000; Garcia, Palou et al. 2010). Aunque nuestras madres postcafetería no han sido sometidas a una restricción calórica forzosa, quizás la menor ingesta observada en estas ratas con el cambio de la dieta de cafetería, podría afectar a la organización neuronal hipotalámica. Cabe destacar, que como se ha descrito en el capítulo 2, las madres postcafetería presentan niveles mayores de leptina, y que la administración oral de leptina durante la lactancia mejora los efectos perjudiciales en la estructura y función hipotalámica causadas por la restricción calórica materna durante la gestación (Konieczna, Garcia et al. 2013). Por tanto, cabe determinar si estos mayores niveles de leptina de las madres postcafetería podrían atenuar efectos deletéreos en la edad adulta.

El hígado y el tejido adiposos son también dos tejidos claves en el manejo, utilización y almacenaje de los nutrientes y su correcto funcionamiento son clave para el mantenimiento de la homeostasis energética y salud metabólica. En rasgos generales, la respuesta metabólica en la expresión de los principales genes implicados en el metabolismo lipídico (captación y oxidación de ácidos grasos, lipogénesis, lipolisis) así como el metabolismo de la glucosa y la señalización de leptina e insulina en estos tejidos (hígado y TAB retroperitoneal) fue similar en crías de madres postcafetería y controles, tanto en crías hembra como macho. De hecho, ni la glicemia ni los niveles de NEFAs circulantes están alterados en las crías de madres postcafetería. Sin embargo, cabe destacar que en codiciones de alimentación *ad libitum*, las crías macho de madres postcafetería presentan un menor peso del hígado.

Durante un ayuno prolongado aumenta la actividad lipolítica en el tejido adiposo para la liberación de NEFAs los cuales son convertidos en cuerpos cetónicos en el hígado para la generación de energía en otros tejidos (Rui 2014). Este es un efecto normal en el organismo como mecanismo de regulación frente a una situación de estrés metabólico. Nuestros resultados sugieren que los niveles de NEFAs en circulación tanto en crías de madres postcafetería como de madres control no presentan diferencia significativa, esto podría sugerir que no existe una alteración en el mecanismo de regulación durante el ayuno ya que las crías de madres postcafetería reaccionan igual que las crías de madres control, esta diferencia se observa también en los niveles de glucosa en respuesta al ayuno.

La expresión de genes lipogénicos (Srebp1c, Fasn y Scd1) a nivel hepático es estimulada por la ingesta de alimentos (Ferre and Foufelle 2007) favoreciendo la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos (Eberle, Hegarty et al. 2004). Como hemos

comentado, los resultados de nuestro estudio sobre la expresión de genes lipogénicos no indican alteraciones en las crías macho de madres postcafetería, ya que responden de igual forma que el grupo control bajo situaciones de alimentación *ad libitum* y ayuno: existe una mayor expresión de estos genes en condiciones de alimentación *ad libitum* y una inhibición en condiciones de ayuno.

En el ayuno los niveles de glucosa disminuyen y el organismo utiliza casi exclusivamente la grasa como fuente de energía. Por lo que se activa la lipolisis en el tejido adiposo para movilizar los triglicéridos almacenados y rendir en NEFAs, que son liberados en el plasma para transportarse al hígado y generar energía (Seitz, Muller et al. 1977; Hashimoto, Cook et al. 2000). En nuestros animales, tanto la expresión hepática de genes implicados en la oxidación de ácidos grasos como la expresión del gen Pnpla2 que codifica para la proteína ATGL, implicada en el primer paso de movilización de los triglicéridos, aumenta en situaciones de ayuno. Por tanto, en las crías de madres postcafetería se observa un correcto funcionamiento del metabolismo energético en respuesta al ayuno.

Si bien, cabe destacar que aunque la respuesta al ayuno fue normal, la expresión basal de algunos genes se encontró alterada en crías de madres postcafetería. Por un lado, las crías hembra de madres postcafetería presentaron en condiciones de alimentación ad libitum menor expresión de los genes lipogénicos estudiados (Srebf1, Fasn, Scd1), mientras que las crías machos de madres postcafetería no presentaron alteraciones en la expresión hepática de estos genes. Por otro lado, los niveles de expresión de genes lipogénicos, lipolíticos, InsR y Cidea en TAB fue menor en las crías macho postcafetería comparado con las controles, mientras que en hembras no se observaron estas alteraciones. Estos resultados muestran diferencias de sexo-dependiente en el manejo de los lípidos y la partición entre los tejidos en crías de madre postcafetería. En estado de alimentación ad libitum, los machos pero no las hembras muestran una menor capacidad para el almacenamiento de grasa en el tejido adiposo. Las hembras presentan mayores niveles circulantes de leptina, que podrían sugerir un mayor tamaño de los depósitos de grasa (favorecido por la expresión de genes lipogéncios), aunque no existen diferencia significativa en el tamaño de los depósitos, o una mayor celularidad de los adipocitos. Se ha descrito que existen diferencias entre ratas macho y hembra en la expresión de genes relacionados con el metabolismo de los lípidos en el hígado en respuesta a una dieta rica en grasas (Priego, Sanchez et al. 2008). Las ratas macho alimentadas con una dieta rica en grasa presentan una mayor tasa de oxidación de ácidos grasos y almacenamiento de triglicéridos en el hígado, y una menor eficacia en el almacenamiento en el tejido adiposo, que puede favorecer la esteatosis hepática (Priego, Sanchez et al. 2008). En cambio, las ratas hembra, exhiben un mayor almacenamiento de grasa en el tejido adiposo, lo que puede relacionarse con un manejo más adecuado de exceso de combustible en comparación con las ratas macho (Priego, Sanchez et al. 2008). Todo ello podría explicar la mayor tendencia de los hombres a tener enfermedades relacionadas con la obesidad.

El aumento de obesidad que ha ocurrido en los últimos años en sociedades desarrolladas, y el hecho de que esta obesidad se asocie a un mayor riesgo a padecer enfermedades metabólicas en la descendencia, ha desencadenado diversas acciones para atenuar los efectos negativos de la obesidad materna. De hecho, se ha sugerido que el perder peso antes del embarazo previene las complicaciones asociadas a la obesidad materna durante la gestación (Glazer, Hendrickson et al. 2004; Getahun, Ananth et al. 2007; Ehrlich, Hedderson et al. 2011). No obstante, la vigilancia metabólica de niños que han nacido después de una pérdida de peso materno antes del embarazo es aun

escasa. Aquí hemos observado que la eliminación de la dieta obesogénica un mes antes del embarazo, pese a que las madres mantienen un cierto grado de obesidad, la respuesta metabólica al ayuno de su descendencia no está alterada. Si bien, en machos hay una menor expresión de genes lipogénicos y lipolíticos en el TAB retroperitoneal que podrían afectar su futura salud metabólica. Si bien, es necesario realizar estudios más a largo plazo para determinar si estos efectos son permanentes y tienen algún impacto real en el metabolismo de estos animales en la edad adulta.

4.3.3 Conclusiones

En conclusión, estos resultados sugieren que si se elimina la dieta de cafetería un mes antes de la gestación en madres con obesidad inducida por la dieta, aunque no se produce una reversión completa del exceso de peso corporal, puede aparentemente evitar los efectos perjudiciales de la obesidad materna sobre el metabolismo lipídico de sus crías, aunque el menor nivel de expresión observado en las crías macho a nivel del TAB retroperitoneal en etapas tempranas podría afectar su salud metabólica en edad adulta.

4.4. Capítulo 4

La normalización de la dieta 1 mes antes de la gestación en ratas con obesidad inducida por la dieta podría mejorar la programación metabólica de las crías, generando un efecto protector frente a ambientes obesogénicos en la descendencia, especialmente en los machos en la edad adulta.

Este estudio tenía como objetivo analizar si el hecho de eliminar una dieta obesogénica un mes antes de la gestación de ratas alimentadas con una dieta de cafetería, puede prevenir los efectos perjudiciales de la obesidad materna en las crías durante la etapa adulta (6 meses) sobre su composición corporal y en la expresión de genes en tejidos clave implicados en la homeostasis energética en respuesta a la exposición a un ambiente obesogénico. Con este propósito ratas macho y hembra de madres control y postcafetería de 4 meses de edad que hasta entonces habían sido alimentadas con dieta control, fueron subdivididas y alimentadas con dieta estándar o con dieta western diet hasta los 6 meses de edad, cuando fueron sacrificadas en condición de alimentación ad libitum. Las animales descendientes de madres del grupo postcafetería, tanto machos como hembras, presentaron una menor ingesta, ganancia de peso y un menor porcentaje de grasa corporal comparado con las crías de madres control cuando fueron alimentados con dieta westen diet. Tras 2 meses de exposición a dieta westen diet las crías macho de madres postcafetería mostraron: i) en el tejido adiposo blanco retroperitoneal, una disminución en la expresión de genes lipogénicos (Ppara, Srebf1, Fasn), Pnpla2, Cpt1b, Insr, Lep y Mest, que no se observó en las crías de madres control; ii) una menor expresión hipotalámica del neuropéptido orexigénico NPY; iii) una menor activación de la expresión de genes relacionados con la lipogénesis hepática (Srebf1, Fas, Scd1) comparado con las crías de madres control. Por tanto, existe un fenómeno de programación metabólica, especialmente en la descendencia masculina, que podría ser atribuido a la eliminación de la dieta obesogénica a ratas con obesidad dietética un mes antes del embarazo, que ha generado un efecto protector en las crías en edad adulta frente a la ganancia de peso, acumulación de grasa, hiperfagia y acumulación hepática de lípidos aún después de la exposición a un ambiente obesogénico.

4.4.1. Resultados

Peso corporal, ingesta y parámetros séricos

Como se ha descrito en el capítulo 2, tras el destete las crías de madres control y postcafetería fueron estabuladas de dos en dos y alimentadas con una dieta estándar hasta los 4 meses de vida. A esta edad, las crías de madres postcafetería presentaron menor peso corporal en comparación con las crías de madres control (ver Figura 4.9 capítulo 2). En este momento, nos planteamos estudiar, la respuesta a la exposición de un ambiente obesogénico, y determinar si el hecho de eliminar la dieta obesogénica a madres obesas un mes antes de la gestación, afecta la capacidad de las crías para responder ante un ambiente obesogénico en la edad adulta.

Con esta finalidad, a los 4 meses de edad, las crías de madres control y postcafetería fueron divididas en dos grupos. Un grupo fue alimentado con una dieta estándar y otro con una dieta comercial hiperlipídica y alta en sacarosa comercial (*western diet*).

Se midió la ingesta total acumulada durante este periodo (2 meses), tanto de los animales alimentados con dietas estándar como con *western diet* (*Figura 4.16*). En machos, los animales de madres control presentaron una menor ingesta calórica que las crías de madres postcafetería, tanto con una dieta estándar, como *western diet*; además sólo las crías de madres control alimentados con *western diet* presentaron mayor ingesta calórica que los alimentados con dieta estándar (p<0,05, efecto interactivo grupo y dieta, ANOVA de dos factores). Las hembras alimentados con *western diet* tuvieron una mayor ingesta calórica que los animales alimentados con dieta estándar (p<0,05, efecto dieta, ANOVA de dos factores), siendo estadísticamente significativo en el grupo postcafetería (p<0,05, test de la t de Student). Además las hembras de madres postcafetería presentaron una menor ingesta calórica comparada con las crías de madres control (p<0,05, efecto tratamiento, ANOVA de dos factores), especialmente las alimentadas con una dieta estándar (p<0,05, test de la t de Student)

Con respecto al peso corporal, como se muestra en la Figura 4.16, los animales descendientes de madres postcafetería (machos y hembras) mantuvieron un menor peso corporal que sus respectivos controles tanto bajo una dieta estándar como con dieta western diet (p<0,05, test de la t de Student) durante todo el período estudiado. Después de dos meses de exposición a la dieta western diet, los animales de madres postcafetería, tanto machos como en hembras, presentaron menor ganancia de peso corporal que los animales de madres control (p<0,05, efecto grupo, ANOVA de dos factores). De hecho, en machos, el incremento de peso corporal, comparando western diet con dieta estándar, fue sólo significativo en los descendientes de madres control (p<0,05, test de la t de Student)

Además, los animales descendientes de madres control y postcafetería que fueron alimentados con una *western diet* tuvieron mayor porcentaje de grasa corporal que los alimentados con una dieta estándar tanto machos como hembras (p<0,05, test de la t de Student). Si bien, las crías del grupo postcafetería alimentados con *western diet* presentaron menor porcentaje de grasa corporal que los animales control alimentados también con *western diet*, especialmente los machos (p<0,05, efecto interactivo entre grupo y dieta, ANOVA de dos factores).

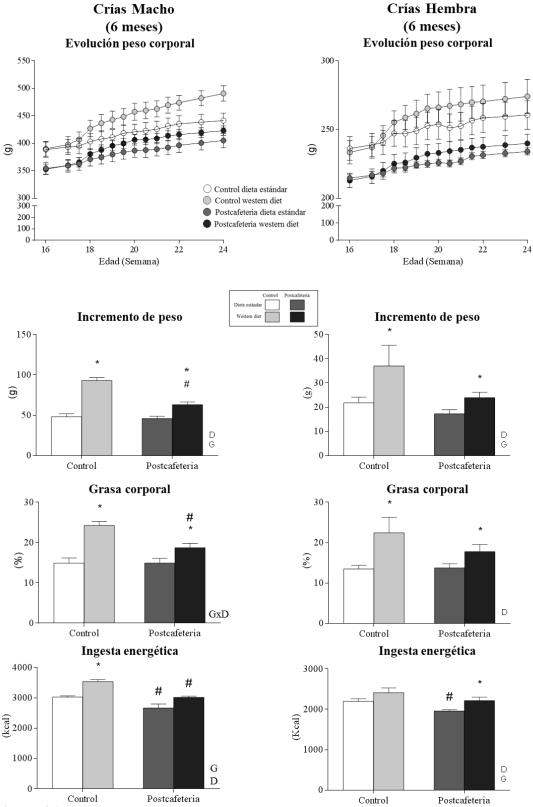


Figura 4.16. Evolución del peso corporal, incremento de peso corporal, % de grasa corporal e ingesta acumulada, de crías (macho y hembra) de madres control o postcafetería, alimentados con una dieta estándar o *western diet* desde los 4 hasta los 6 meses de edad. Estadística: # postcafetería vs control (p<0,05, test de la t de Student). *, Dieta estándar vs *western diet* (p<0,05, test de la t de Student). Los datos son la media ± SEM (n=6-12), G, efecto grupo (control/postcafetería); D, efecto dieta (Dieta estándar/western diet); GxD, efecto interactivo entre grupo y dieta, (p<0,05, ANOVA de dos factores).

Los resultados observados en el porcentaje de grasa corporal, se correlacionan con los resultados del peso de los depósitos de tejido adiposo blanco (Tabla 4.4). Los animales alimentados con *western diet*, tanto machos como hembras, presentaron mayor tamaño de los principales depósitos de tejidos adiposos blancos (inguinal, mesentérico, retroperitoneal y gonadal). Si bien, es importante destacar que las crías macho de madres del grupo postcafetería y que fueron alimentados con *western diet* tuvieron un menor peso de estos depósitos comparado con los controles (p<0,05, efecto interactivo entre grupo y dieta, ANOVA de dos factores).

Analizamos también el tamaño del hígado y la cantidad de lípidos hepáticos. En machos, el tamaño del hígado y la cantidad de lípidos hepáticos fueron mayores en animales alimentados con *western diet* comparado con los alimentados con una dieta estándar, tanto en crías de madres control como postcafetería, aunque las crías de madres postcafetería mostraron menores niveles de lípidos comparados con las crías de madres control (p<0,05, efecto interactivo entre grupo y dieta, ANOVA de dos factores). En las hembras no hubo diferencia.

Se analizaron los niveles plasmáticos de glucosa, leptina y NEFAs en condiciones de alimentación *ad libitum* o tras 12 h de ayuno (Tabla 4.4). La glucemia en condiciones de alimentación *ad libitum* fue similar en todos los grupos estudiados. Los niveles circulantes de glucosa en ayuno fueron mayores en los animales alimentados con *western diet* tanto en crías de madres control como postcafetería en el caso de los machos (p<0,05, efecto dieta, ANOVA de dos factores) y en el caso de las hembras sólo en las crías de madres postcafetería (p<0,05, efecto interactivo entre grupo y dieta, ANOVA de dos factores). Por otra parte los niveles de leptina en ayuno fueron mayores en los animales alimentados con *western diet* que con dieta estándar tanto en crías de madres control como postcafetería, en machos y en hembras (p<0,05, efecto grupo, ANOVA de dos factores). No obstante, bajo una dieta *western diet*, es importante mencionar que los niveles de leptina en condiciones de alimentación *ad libitum* fueron menores en las crías machos de madres postcafetería comparados con los controles (p<0,05, efecto interactivo entre tratamiento y condición de alimentación, ANOVA de dos factores).

Las hembras alimentadas con una dieta *western diet*, presentan mayores niveles circulantes de NEFAs que las alimentadas con una dieta estándar. Con el ayuno, las crías macho de madres postcafetería alimentados con *western diet* y las crías hembra, tanto con dieta estándar como con *western diet* presentaron menores niveles de NEFAs circulantes que las crías de madres control (p<0.05, test de la t de Student).

Tabla 4.4. Peso de los diferentes depósitos de tejido adiposo blanco (TAB) e hígado, lípidos hepáticos y niveles circulantes de glucosa, leptina y ácidos grasos libres en condiciones de alimentación *ad libitum* y en ayuno, de crías (macho y hembra) de madres control o postcafetería, alimentados con una dieta estándar (D.Std) o *western diet* (WD) desde los 4 hasta los 6 meses de edad.

		Machos		Hembras			
		Control	Postcafetería	ANOVA	Control	Postcafetería	ANOVA
TAD in main al (a)	D.Std	$10,9 \pm 1,1$	$9,1 \pm 0,8$	G	$3,2 \pm 0,6$	$2,8 \pm 0,3$	D
TAB inguinal (g)	WD	15,1 ± 1,4*	10,3 ± 1,0#	D	5,3 ± 1,3	$3,6 \pm 0,6$	
TAB mesentérico	D.Std	$4,2 \pm 0,4$	$4,2 \pm 0,4$	C D	$2,6 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,1$	G D
(g)	WD	9,1 ± 0,7 *	5,2 ± 0,3#	GxD	4,0 ± 0,5*	2,8 ± 0,3#	
TAB	D.Std	$9,5 \pm 0,9$	$8,3 \pm 0,7$	G	$3,7 \pm 0,6$	$3,3 \pm 0,3$	D
retroperitoneal (g)	WD	18,3 ± 1,2*	14,1 ± 0,9*#	D	6,6 ± 1,3*	4,8 ± 0,6*	
TAD Island	D.Std	$9,1 \pm 0,8$	$7,8 \pm 0,5$	C D	5,8 ± 0,4	$5,1 \pm 0,3$	D
TAB gonadal (g)	WD	17.0 ± 1,3*	11,9 ± 0,7*#	GxD	10,5 ± 1,9*	8,3 ± 1,0*	
Tr. I. (a)	D.Std	$12,5 \pm 0,4$	$12,4 \pm 0,5$	GxD	$7,6 \pm 0,2$	$7,0 \pm 0,2$	
Hígado (g)	WD	17,3 ± 0,8*	14,0 ± 0,6*#		$7,8 \pm 0,7$	$7,3 \pm 0,3$	
Glucosa en ad	D.Std	121 ± 4	123 ± 5		113 ± 3	115 ± 5	
libitum (mg/dL)	WD	133 ± 8	126 ± 4		114 ± 3	113 ± 3	
Glucosa en ayuno	D.Std	99 ± 3	103 ± 3	D	84 ± 3	91 ±2	GxD
(mg/dL)	WD	124 ± 5*	118 ± 7		105 ± 8*	91 ± 3	
Leptina ad libitum	D.Std	4250 ± 719	3536 ± 407	GxD	2553 ±366	2224 ± 256	D
(pg/mL)	WD	10031 ± 906*	5597 ± 811*#		4588 ± 1121	3329 ± 393*	
Leptina en ayuno	D.Std	2608 ± 509	1772 ± 323	G	1082 ± 193	1189 ± 128	D
(pg/mL)	WD	5367 ± 713*	3715 ± 483*	D	2153 ± 748	2417 ± 683*	Б
NEFAs ad libitum	D.Std	$0,61 \pm 0,18$	$0,71 \pm 0,14$		$1,24 \pm 0,33$	$0,81 \pm 0,14$	D
(mM)	WD	$0,84 \pm 0,13$	$0,86 \pm 0,13$		$1,54 \pm 0,25$	$1,09 \pm 0,11$	
NEFAs en ayuno (mM)	D.Std	$1,\!27 \pm 0,\!14$	$1,36 \pm 0,14$		0.98 ± 0.16	$1,49 \pm 0,14 \#$	
	WD	$1,59 \pm 0,08$	1,32 ± 0,08#		$1,75 \pm 0,18*$	1,27 ± 0,13#	
Lípidos en hígado	D.Std	$34,0 \pm 2,0$	$35,6 \pm 2,3$	GxD	$37,9 \pm 1,6$	$40,8 \pm 5,2$	
(mg/g tejido)	WD	110 ± 7,5*	74,8 ± 6,3*#	GAD	$38,5 \pm 2,2$	$38,8 \pm 2,7$	

Abreviaturas: NEFAs, ácidos grasos libres no esterificados; TAB, tejido adiposo blanco; Estadística: # Postcafetería vs control (p<0,05, test de la t de Student). *, western diet vs Dieta estándar (p<0,05, test de la t de Student). Los datos son la media ± SEM (n=6-12), G, efecto grupo (control/postcafetería); D, efecto dieta (dieta estándar/western diet); GxD, efecto interactivo entre grupo y dieta, (p<0,05, ANOVA de dos factores).

Expresión de genes relacionados con el balance energético en el hipotálamo

Los niveles de expresión de ARNm de Lepr, Ghsr, Socs3, Stat3, Npy y Pomc en el hipotálamo se muestran en la Figura 4.17.

En machos no se observaron cambios en la expresión de Ghsr y Lepr. Sin embargo, las crías hembra de madres postcafetería presentan una mayor expresión hipotalámica de estos genes (p<0,05, efecto grupo, ANOVA de dos factores), y los animales alimentados con *western diet* tienen una mayor expresión de estos genes, particularmente de Lepr (p<0,05, efecto dieta, ANOVA de dos factores).

Los niveles de expresión de Stat3 en los machos del grupo control son menores en los animales alimentados con *western diet* (p<0,05, efecto dieta, ANOVA de dos factores). Cabe destacar, que las crías macho de madres postcafetería alimentados con dieta estándar presentaron menores niveles de expresión de Stat3 que los controles (p<0,05, test de la t de Student). En cambio, las crías hembras de madres postcafetería que fueron alimentadas con *western diet* muestran una elevada expresión de este gen con respecto a las crías de madres control (p<0,05, efecto interactivo entre grupo y dieta, ANOVA de dos factores).

Las crías hembra alimentadas con *western diet* tuvieron mayores niveles de expresión del ARNm de Socs3 comparado con las alimentados con dieta estándar (p<0,05, efecto dieta, ANOVA de dos factores). En los machos, no se observaron cambios en la expresión de este gen. La expresión de Npy se encuentra disminuida en crías macho y aumentada en crías hembras de madres postcafetería, comparado con las crías de madres control (p<0,05, efecto grupo, ANOVA de dos factores).

Es importante mencionar que mientras los niveles de expresión en machos de Pomc y Npy disminuyen en animales alimentados con *western diet* (p<0,05, efecto dieta, ANOVA de dos factores), en las hembras se produce un efecto opuesto, ya que se incrementan los niveles de expresión de ARNm de estos genes, de forma significativa en el caso del Npy (p<0,05, efecto dieta, ANOVA de dos factores).

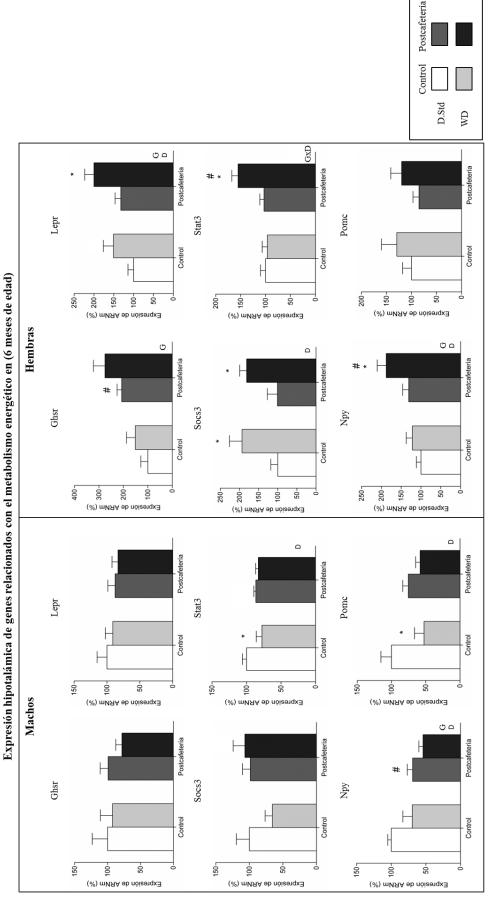


Figura 4.17. Expresión de genes relacionados con el metabolismo energético en el hipotálamo de ratas macho y hembra madres control o de madres del grupo postcafetería alimentadas con una dieta estándar (D. 12). Los genes analizados fueron: Ghsr, Lepr, Socs3, Stat3, Npy y Pomc. Estadistica: G, efecto grupo (control/postcafetería); D, efecto dieta (estándar/western diet); GxD, efecto interactivo entre grupo y dieta (p<0,05, ANOVA de dos factores). # Postcafetería vs control (p<0,05, test de la t de Student). *, westen diet vs dieta estándar (p<0,05, test de la t de Student).

Expresión de genes relacionados con el metabolismo energético en el hígado.

Los resultados que muestran la expresión de genes que participan en la utilización y metabolismo de los nutrientes en el hígado se muestran en las Figuras 4.18 (machos) y 4.19 (hembras).

Con la ingesta de *western diet*, se observa que las crías macho de madres control presenta una mayor expresión de genes lipogénicos (particularmente de Srebf1 y Scd1), pero este aumento no se produce en las crías macho de madres postcafetería (p<0,05, efecto interactivo entre grupo y dieta, ANOVA de dos factores). En las crías hembras alimentadas con *western diet* se observa una mayor expresión de los genes lipogénicos (Srebf1 y Scd1) comparado con las alimentadas con dieta estándar, tanto en crías de madres control como en crías de madres postcafetería (p<0,05, efecto dieta, ANOVA de dos factores).

Por otro lado, y respecto a los genes que participan en la oxidación de ácidos grasos, los animales, tanto machos como hembras, de madres postcafetería no presentan cambios significativos en los niveles de expresión de ARNm para Ppara y Pdk4. Tampoco se observaron cambios por efecto de la dieta *western diet*. Sin embargo, el nivel de expresión de Cpt1a se incrementa en crías machos de madres postcafetería y control que fueron alimentados con *western diet* (p<0,05, efecto dieta, ANOVA de dos factores); este aumento se ve reflejado también en las hembras alimentadas, pero solo en las crías de madres postcafetería (p<0,05, test de la t de Student).

No se observaron cambios en la expresión de ARNm de Cd36 ni Gck.

En relación a la expresión de genes relacionados con la señalización de la leptina y la insulina, se observó mayor expresión en los niveles de ARNm para Lepr en los machos alimentados con *western diet* tanto en el grupo control como postcafetería, especialmente en el grupo control (p<0,05, test de la t de Student). En las hembras no hubo cambios significativos en la expresión de este gen. Respecto a Socs3, en machos los niveles de expresión fueron menores en los animales alimentados con *western diet* en comparación con los animales alimentados con dieta estándar tanto en el grupo control como postcafetería (p<0,05, efecto dieta, ANOVA de dos factores). En hembras se pudo observar que el nivel de expresión de este gen fue mayor las crías de madres postcafetería en comparación las crías de madres control (p<0,05, efecto grupo, ANOVA de dos factores).

En machos, el nivel de expresión de Insr fue mayor en las crías de madres postcafetería alimentadas con dieta estándar (p<0,05, efecto grupo, ANOVA de dos factores). Además la expresión de Insr fue menor en los animales alimentados con *western diet* (p<0,05, efecto dieta, ANOVA de dos factores), comparado con los alimentados con dieta estándar, aunque esta menor expresión fue solo significativa en las crías postcafetería (p<0,05, test de la t de Student).

No se observaron cambios en los niveles de expresión de Irs1 en machos, sin embargo las hembras alimentadas con *western diet* tuvieron un menor nivel de expresión de este gen en comparación con las hembras alimentadas con dieta estándar, tanto en crías de madres control como postcafetería (p<0,05, efecto dieta, ANOVA de dos factores).

Postcafetería

Control

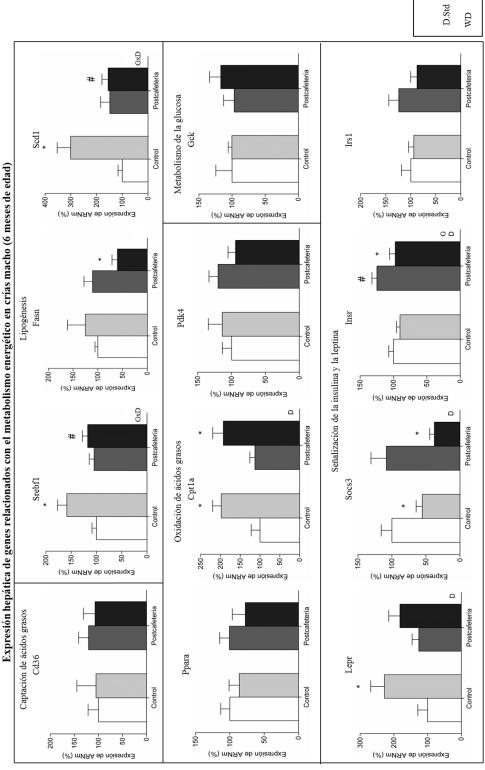


Figura 4.18. Expresión de genes relacionados con el metabolismo energético (captación de ácidos grasos, lipogénesis, oxidación de ácidos grasos, metabolismo de la glucosa y señalización de la leptina y la insulina) en higado de crias macho de madres control o postcafetería alimentadas con una dieta estándar (D. Std) o western diet (WD) desde los 4 hasta los 6 meses de edad. Los datos son la media ± SEM (Control: dieta estándar=8, western diet=8; dieta estándar=9, western diet=10). Los genes analizados fueron: Cd36, Srebfl, Fasn, Scd1, Ppara, Cpl1a, PGk4, Gck, Lepr, Inst, Socs3e Irsl. Estadistica: G, efecto grupo (control/postcafetería); D, efecto dieta (estándar/western diet); GxD, efecto interactivo entre grupo y dieta, (p<0,05, ANOVA de dos factores). # Postcafetería vs control (p<0,05, test de la t de Student). *, westen diet vs dieta estándar (p<0,05, test de la t de Student).

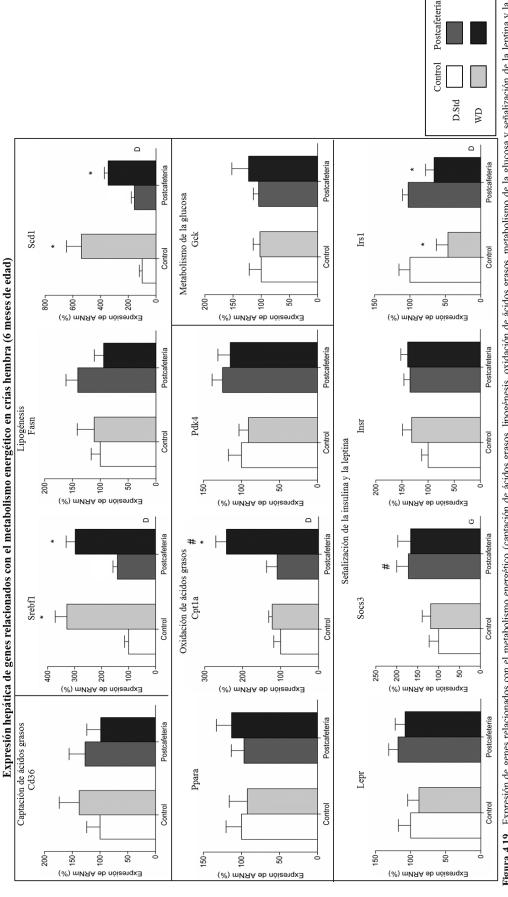


Figura 4.19. Expresión de genes relacionados con el metabolismo energético (captación de ácidos grasos, lipogénesis, oxidación de ácidos grasos, metabolismo de la glucosa y señalización de la leptina y la (Control: dieta estándar=8, western diet=6; dieta estándar=12, western diet=10). Los genes analizados fueron: Cd36, Srebf1, Fasn, Scd1, Ppara, Cpt1a, Pdk4, Gck, Lepr, Insr, Socs3e Irs1. Estadística: G, efecto insulina) en higado de crías hembra de madres control o postcafetería alimentadas con una dieta estándar (D. Std) o westem diet (WD) desde los 4 hasta los 6 meses de edad. Los datos son la media ± SEM control/postcafeteria); D, efecto dieta (estândar/western diet); GXD, efecto interactivo entre grupo y dieta, (p<0.05, ANOVA de dos factores). # Postcafeteria vs control (p<0.05, test de la t de Student). *, westen diet vs dieta estándar (p<0,05, test de la t de Student).

Expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico en tejido adiposo blanco retroperitoneal.

Los resultados que muestran la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico en este tejido adiposo se presentan en las Figuras 4.20 (machos) y 4.21 (hembras).

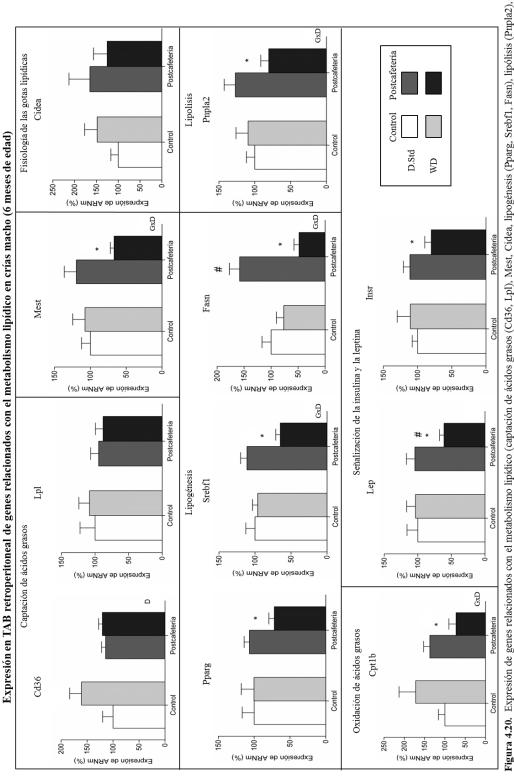
Respecto a los genes relacionados con la captación de ácidos grasos observamos que la expresión de Cd36 aumenta en los machos y hembras del grupo control alimentados con *western diet* comparado con los alimentados con dieta estándar, sin embargo en el grupo postcafetería este incremento no se produce (p<0,05 (hembras) y p=0.07 (machos), efecto interactivo grupo y dieta, ANOVA de dos factores). No hubo cambios significativos en la expresión de Lpl.

Se analizó el nivel de expresión de Mest, dado el papel que juega en la regulación del crecimiento de adipocitos y en la acumulación lipídica (Takahashi, Kamei et al. 2005; Nikonova, Koza et al. 2008; Huntriss, Hemmings et al. 2013). Encontramos una menor expresión de Mest en las crías de madres postcafetería (machos y hembras) alimentados con *western diet*, especialmente en los machos (p<0,05, efecto interactivo entre grupo y dieta, ANOVA de dos factores). Los niveles de Cidea, implicado en la fisiología de las gotículas lipídicas, fueron similares en todos los grupos estudiados.

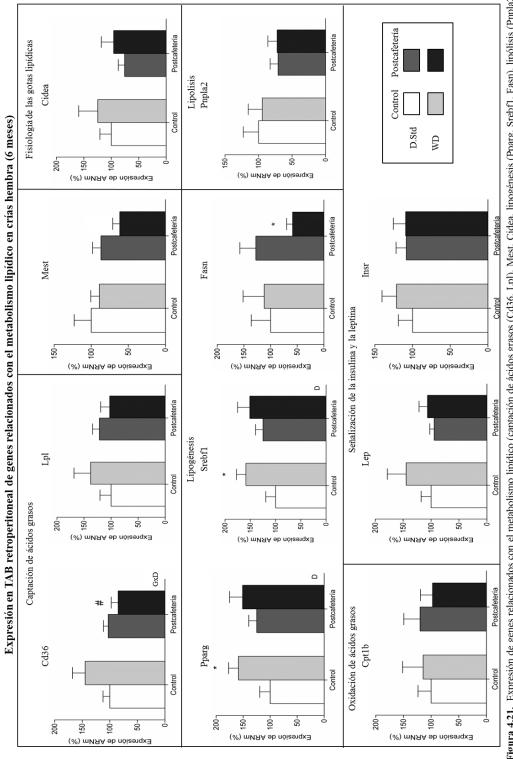
En relación con los genes lipogénicos, cabe destacar, que en crías macho de madres control los niveles de expresión de los genes lipogénicos estudiados no se vio alterada por la ingesta de una dieta *western diet*, Sin embargo, en los machos del grupo postcafetería alimentados con *western diet*, se encontró unu menor nivel de expresión de ARNm para Pparg, Srebf1 y Fasn comparado con crías macho de madres postcafetería alimentados con dieta estándar. (p<0,05, efecto interactivo entre grupo y dieta, ANOVA de dos factores). Cabe destacar que bajo una dieta estándar las crías macho de madres postcafetería muestran una mayor expresión de Fasn que las crías controles (p<0,05, test de la t de Student). En las hembras se observó una mayor expresión de Pparg y Srebpf1 en las alimentadas con *western diet* en comparación con las hembras alimentadas con dieta estándar (p<0,05, efecto dieta, ANOVA de dos factores). La expresión de ARNm de Fasn fue menor en las crías hembras de madres postcafetería alimentadas con *western diet*, en comparación a las alimentadas con dieta estándar (p<0,05, test de la t de Student).

Al igual que los resultados encontrados en genes lipogénicos, el nivel de expresión de ARNm de Pnpla2 y Cpt1b fueron menores en las crías machos de madres postcafetería alimentadas con *western diet* comparado con los alimentados con dieta estándar, mientras que en las crías de madres control no se observó esta diferencia (p<0,05, efecto interactivo entre grupo y dieta, ANOVA de dos factores). No se observaron diferencias significativas en la expresión de estos genes en hembras.

Por otra parte los machos postcafetería alimentados con *western diet* también presentaron menores niveles de expresión de Leptina y del receptor de la insulina comparado con los alimentados con una dieta estándar (p<0,05, test de la t de Student). Estas diferencias no se producen en las hembras.



oxidación de ácidos grasos (Cpt1b), leptina y señalización de la leptina insulina (Insr) en tejido adiposo blanco retroperiotneal de crias macho de madres control o postcafetería alimentadas con una dieta estándar (D. Std) o western diet (WD) desde los 4 hasta los 6 meses de edad. Los datos son la media ± SEM (Control: dieta estándar=8, western dieta8, desde los 4 hasta los 6 meses de edad. Los datos son la media ± SEM (Control: dieta estándar=8, western dieta8, western dieta8, desde los 4 hasta los 6 meses de edad. Los datos son la media ± SEM (Control: dieta estándar=8, western dieta8, desde los 4 hasta los 6 meses de edad. Los datos son la media ± SEM (Control: dieta estándar=8, western dieta8, desde los 4 hasta los 6 meses de edad. Los datos son la media ± SEM (Control: dieta estándar=8, western dieta8, desde los 4 hasta los 6 meses de edad. Los datos son la media ± SEM (Control: dieta8, desde los 6 meses de edad. Los datos de la meses estándar=9, western diet=10). Estadística: G, efecto grupo (control/postcafetería); D, efecto dieta (estándar/western diet]; GXD, efecto interactivo entre grupo y dieta , (p<0,05, ANOVA de dos factores). # Postcafetería vs control (p<0,05, test de la t de Student). *, westen diet vs dieta estándar (p<0,05, test de la t de Student).



oxidación de ácidos grasos (Cpt1b), leptina y señalización de la leptina insulina (Insr) en tejido adiposo blanco retroperiotneal de crías hembra de madres control o postcafetería alimentadas con una dieta estándar (D. Std) o western diet (WD) desde los 4 hasta los 6 meses de edad. Los datos son la media ± SEM (Control: dieta estándar=8, western dieta-6, dieta Figura 4.21. Expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico (captación de ácidos grasos (Cd36, Lpl), Mest, Cidea, lipogénesis (Pparg, Srebfl, Fasn), lipólisis (Prpla2), estándar=12, western diet=10). Estadística: G, efecto grupo (control/postcafeteria); D, efecto dieta (estándar/western diet); GxD, efecto interactivo entre grupo y dieta, (p<0,05, ANOVA de dos factores). # Postcafeteria vs control (p<0,05, test de la t de Student). *, westen diet vs dieta estándar (p<0,05, test de la t de Student).

4.4.2. Discusión

Este estudio tenía como objetivo analizar si el hecho de eliminar una dieta obesogénica un mes antes de la gestación en ratas alimentadas con una dieta de cafetería, puede prevenir los efectos perjudiciales de la obesidad materna en las crías durante la etapa adulta (6 meses) sobre su composición corporal y en la expresión de genes en tejidos clave de la homeostasis energética, aún después de ser expuestas a un ambiente obesogénico. Con este propósito ratas macho y hembra de madres control y postcafetería de 4 meses de edad que hasta entonces habían sido alimentadas con dieta estándar, fueron subdivididas y alimentadas, un grupo continuó con dieta estándar y otro grupo fue alimentado con western diet hasta los 6 meses de edad, cuando fueron sacrificados en condición de alimentación ad libitum. Existen estudios que han evaluado el efecto de una sobrealimentación durante la gestación sobre la descendencia, provocando cambios en la descendencia en su capacidad de respuesta frente a diversas enfermedades metabólicas (Langley-Evans 1996). Una gran parte de las investigaciones se enfocan sobre los efectos que una dieta materna elevada en grasas durante la etapa gestacional y/o de lactancia (Khan, Dekou et al. 2004; Bayol, Simbi et al. 2005) puede producir, como hiperinsulinemia y resistencia a la insulina en las crías en la edad adulta (Vickers, Breier et al. 2000; Krechowec, Vickers et al. 2006). En este sentido, también existe evidencia en estudios realizados en humanos en donde los hijos de madres con obesidad o diabetes, presentan mayores riesgos de desarrollar obesidad en etapas adultas (Clausen, Mathiesen et al. 2008).

En esta tesis doctoral, hemos desarrollado un modelo de obesidad dietética materna (ver capítulo 4.2). Hemos observado que la ingesta de dieta de cafetería genera un aumento exacerbado de peso y grasa corporal. Se ha sugerido que dichos cambios provocados por una dieta obesogénica en las madres pueden generar señales de programación que se manifiestan y pueden afectar en el desarrollo de las crías (Elahi, Cagampang et al. 2009). Como hemos comentado anteriormente, el aumento generalizado de obesidad, y en particular de mujeres en edades reproductivas, puede condicionar que cada vez haya más efectos adversos debidos a la obesidad materna en el desarrollo de obesidad. No existe un consenso general sobre las pautas de pérdida de peso durante el periodo pregestacional, parece ser que en la medida de lo posible es recomendable evitar restricciones calóricas durante la gestación. Por ello, estudios en los que se analice el efecto de la pérdida de peso antes de la gestación son necesarios.

Nos planteamos estudiar el efecto que tiene eliminar la dieta obesogénica, a ratas hembras con obesidad dietética, 1 mes antes de la gestación. Hemos observado que al eliminar la dieta obesogénica antes del embarazo existen una serie de efectos protectores frente a la obesidad en las crías, tanto a una edad temprana como en la edad adulta. Pero además hemos analizado si dichos efectos protectores frente a la obesidad se siguen manteniendo en etapas adultas incluso después de la exposición a un ambiente obesogénico. Los animales de madres postcafetería presentaron menor ganancia de peso corporal aun cuando éstos fueron expuestos durante 2 meses a una western diet. Este efecto protector frente a la ganancia de peso ya se veía durante la lactancia en crías de madres postcafetería, e incluso después de hacer un seguimiento más a largo plazo, seguía manteniendo hasta las 4 meses (Capítulo 4.2), aunque las madres postcafetería no hubieron revertido completamente el aumento de grasa corporal. Por tanto a diferencia de resultados de otros estudios que indican que la obesidad materna predispone a las crías a una ganancia de peso (Lecoutre and Breton 2015), parece ser que la eliminación de la dieta obesogénica antes de la gestación, con la consiguiente pérdida de peso y grasa corporal previene frente al aumento de peso de la descendencia. Además de la menor ganancia de peso, hemos visto que en edad adulta las crías de madres postcafetería expuestas a *western diet* acumulan menos grasa corporal que las crías de madres control alimentadas también con esta misma dieta. Por tanto, la eliminación de la dieta obesogénica antes del embarazo también previene frente a una mayor adiposidad. Se ha descrito que la obesidad materna, aparte de predisponer a las crías a una mayor ganancia de peso, también incrementa la propensión a presentar una mayor adiposidad en la etapa adulta (Murabayashi, Sugiyama et al. 2013). En línea con nuestros resultados, Zambrano et al, describieron que los efectos de la obesidad materna sobre la descendencia son reversibles, en términos de peso y adiposidad corporal y resistencia a la insulina, con el cambio a una dieta no obesogénica antes de la gestación, (Zambrano, Martinez-Samayoa et al. 2010).

La ingesta de una dieta elevada en grasas y carbohidratos, como la western diet, provoca una ingesta energética elevada promoviendo la ganancia de peso corporal (Hu, van Dam et al. 2001; Kanoski and Davidson 2011), diversos mecanismos a nivel de hipotálamo podrían estar implicados en la alteración de dicha ingesta alimenticia (Benoit, Kemp et al. 2009). Curiosamente, en nuestro estudio las crías de madres postcafetería alimentadas con western diet presentan menor ingesta energética que las crías de madres control alimentadas también con western diet. Este resultado podría explicar la menor acumulación de grasa y peso corporal así como menor peso de los diferentes tejidos adiposos. En el capítulo 4.3 se ha descrito que a los 26 días de edad, 5 días tras el destete, las crías de madres postcafetería presentan una menor expresión de genes relacionados con el control de la ingesta (Ghsr, Lepr, Socs 3, Stat3, Npy y Pomc). Curiosamente, esta menor expresión de genes hipotalámicos no se mantiene en los animales de madres postcafetería en la edad adulta, con la excepción del Npy en el caso de los machos. Esta menor expresión de Npy, un neuropéptido orexigénico, podría explicar la menor ingesta observada en estos animales. Por tanto, la programación de la menor expresión de Npy, ya desde etapas tempranas en las crías macho de madres postcafetería podría ser uno de los mecanismos de programación metabólica temprana por el que las crías macho de madres postcafetería presentan una menor ingesta y una protección frente a la ganancia de peso y adiposidad corporal.

Una dieta materna elevada en grasa predispone a una serie de complicaciones metabólicas en el feto que persisten hasta la edad adulta, como la ganancia de peso y grasa corporal y el incremento en los niveles de glucosa y colesterol. También se ha descrito que existe una mayor acumulación de lípidos hepáticos, no solo durante la etapa fetal sino también en edad adulta (McCurdy, Bishop et al. 2009). Una de las complicaciones de la obesidad es la acumulación en el hígado de triglicéridos de forma no controlada, ,lo que puede desencadenar esteatosis hepática y finalmente en cirrosis hepática (Fabbrini and Magkos 2015). Nuestros resultados muestran que las crías macho de madres postcafetería que han sido alimentados con western diet tienen una menor acumulación hepática de lípidos comparado con las crías de madre control; en hembras no se producen cambios. Se ha descrito que una desregulación de la lipogénesis puede contribuir a la acumulación excesiva de masa grasa en personas con obesidad (Diraison, Dusserre et al. 2002). Hemos encontrado que las crías de madres postcafetería alimentados con western diet expresan en el hígado menores niveles de genes lipogénicos comparado con los animales de madres control también alimentados con western diet. Aunque el mecanismo molecular que conduce al desarrollo de esteatosis hepática es complejo, el aumento de la síntesis de novo hepática de ácidos grasos contribuye al desarrollo de esta enfermedad (Postic and Girard 2008). Por tanto, la reversión de la dieta de cafetería en hembras obesas un mes antes de la gestación,

previene de predisposición a alteraciones metabólicas a nivel hepático, que se producen en descendientes de madres obesas.

La expresión génica de genes implicados en el metabolismo lipídico en el tejido adiposo retroperitoneal, sugiere que las crías macho de madres postcafetería responden de manera diferente a la western diet, comparado con las cría de madres control. Las crías macho de madres postcafetería presentan una disminución en expresión de genes relacionados con la lipogénesis (Pparg, Srebf1 y Fasn) y de Pnpla2, que codifica para ATGL, enzima implicada en el primer paso de la lipolisis, así como de genes relacionados con la oxidación de ácidos grasos. La menor ingesta, junto con la menor activación de la lipogénesis en el tejido adiposo, podría explicar, la menor acumulación de grasa observada en las crías de madres postcafetería. En este sentido, es de destacar, que tanto la expresión de Mest y de leptina en el TAB retroperitoneal, así como los niveles circulantes de leptina, están disminuidas en los machos de madres postcafetería. Recientemente, se ha propuesto que la expresión del gen de la leptina y Mest en tejido adiposo blanco son marcadores predictivos de la expansión del tejido adiposo (Voigt, Ribot et al. 2015). Estos resultados podrían indicar una posible marca de programación metabólica que se ha desarrollado desde etapas tempranas que ya hemos observado (capítulo 4.3) en el tejido adiposo de crías de madres postcafetería de 26 días de edad donde el nivel de expresión de estos genes fue menor que el de las crías de madres control.

Cabe destacar, que la glucemia fue normal tanto en crías de madres control como en crías de madres postcafetería tras 1os 2 meses de la ingesta de la dieta *western diet*. La respuesta al ayuno tampoco se ve alterada en los animales alimentados con *western diet*, como ya se veía en estos animales a la edad de 4 meses (capítulo 4.2). Los NEFAs representan una de las principales fuentes energéticas durante el ayuno. Nuestros resultados indican que los animales de madres postcafetería alimentados con *western diet* no presentan un aumento en los niveles circulantes de NEFAs en comparación con los animales que han consumido una dieta estándar, como ocurre en las crías de madres control.

4.4.3. Conclusiones

Los animales de madres postcafetería presentaron tras 2 meses de exposición a una dieta western diet, una menor ganancia de peso y grasa corporal comparado con las crías de madres control. Los animales postcafetería que han sido alimentados con western diet presentan menor ingesta energética, este resultado podría explicar el menor porcentaje de grasa y peso corporal así como menor tamaño de los diferentes tejidos adiposos.

Esta menor adiposidad podría en parte explicarse por la menor expresión de genes lipogénicos que se observa en machos de madres postcafetería alimentados con dieta western diet. El hecho de que las crías macho de madres postcafetería mostraran, ya en en edades tempranas una menor expresión de los genes lipogénicos en el TAB, sugiere que podría existir un efecto de programación metabólica, ya detectado en edades tempranas y que se manifiesta en la edad adulta ante una dieta obesogénica.

La menor expresión hipotalámica del neuropéptido orexigénico NPY, observada en las crías macho de madres postcafetería en la edad adulta, y que ya se observaba en etapas tempranas, podría suponer un posible efecto de programación metabólica originada por la reversión en las madres de la dieta obesogénica antes del embarazo, y que podría verse reflejado en etapas adultas regulando la ingesta energética. De hecho, las crías de

madres postcafetería tienen una menor ingesta calórica, incluso cuando han sido expuestos a una dieta apetecible y alta en grasas y sacarosa como la *western diet*.

Además, en las crías macho de madres postcafetería alimentadas con *western diet* se observa una menor acumulación hepática de lípidos, que podría explicarse por la menor activación de la expresión de genes relacionados con la lipogénesis hepática que se observa en estos animales comparado con las crías de madres control.

Por tanto, existe un fenómeno de programación metabólica, especialmente en la descendencia masculina, que podría ser atribuido a la eliminación de la dieta obesogénica en ratas con obesidad dietética un mes antes del embarazo, que ha generado un efecto protector en las crías en edad adulta frente a la ganancia de peso, acumulación de grasa, hiperfagia y acumulación hepática de lípidos aún después de la exposición a un ambiente obesogénico.

RECAPITULACIÓN

5. Recapitulación

Los resultados que se presentan en esta tesis doctoral, están integrados en 4 manuscritos originales. El presente proyecto de investigación tiene como finalidad evaluar el efecto de un periodo corto de exposición a una dieta de cafetería en etapas tempranas y analizar si la reversión de la dieta de cafetería antes del embarazo previene los efectos perjudiciales de la obesidad materna en la descendencia. La mayoría de los estudios de investigación evalúan los efectos de la obesidad materna durante la gestación y/o lactancia sobre la descendencia, sin embargo, falta información sobre la normalización de una dieta obesogénica antes del embarazo así como de los posibles efectos en la descendencia en edades tempranas y tardías. Se eligió la dieta de cafetería debido a que se ha descrito como una herramienta importante para inducir hiperfagia voluntaria y, por lo tanto, desarrollo de sobrepeso/obesidad en ratas; además refleja en gran medida el comportamiento de una dieta occidental en humanos (Pico, Pons et al. 1991; Akyol, McMullen et al. 2012; Oliver, Reynes et al. 2013).

Los efectos de la ingesta de una dieta de cafetería en ratas adultas han sido ampliamente descritos, sin embargo, se conoce poco acerca de los efectos a corto plazo de esta dieta obesogénica. Es evidente la necesidad de establecer estrategias nutricionales de prevención en etapas tempranas ante la prevalencia de obesidad y sobrepeso a nivel mundial. Como parte de nuestra investigación, analizamos los efectos de una corta exposición a una dieta obesogénica durante etapas tempranas, con la finalidad de conocer los eventos moleculares que pueden condicionar los efectos más a largo plazo de este tipo de dieta. Con este propósito, crías macho de 10 días de edad fueron expuestas a una dieta de cafetería, edad aproximada en la que ocurre la transición natural de la dependencia de leche materna al consumo de alimentos sólidos (Oliver, Pico et al. 2002). La ingesta durante 12 días con una dieta de cafetería indujo hiperfagia y por lo tanto un exceso de calorías consumidas, de las cuales el 46% provenía de la grasa, además un marcado aumento de los depósitos de grasa corporal. Tras este corto periodo, los animales cafetería tuvieron casi el doble de grasa corporal que las ratas control. La acumulación excesiva de grasa corporal durante etapas infantiles es motivo de especial preocupación, va que un rápido crecimiento y una adiposidad temprana en humanos han sido propuestos como marcadores tempranos de obesidad en edad adulta (Brisbois, Farmer et al. 2012). Además, los animales alimentados con dieta de cafetería presentaron niveles circulantes de leptina altos, reflejando el mayor tamaño de los depósitos de grasa corporal y una baja expresión hipotalámica de Npy comparados con los animales control. La elevada ingesta calórica observada en estos animales, está por encima de sus necesidades metabólicas, y representa una clara disfunción en el control de la ingesta y del balance energético. Además, el fracaso de esta hiperleptinemia en producir alguna reducción compensatoria de la ingesta puede ser interpretada como una evidencia de la resistencia a la leptina (Morrison, Huypens et al. 2009). En el tejido adiposo blanco retroperitoneal (TAB), los animales alimentados con dieta de cafetería presentan una alteración en la respuesta a las condiciones de ayuno/alimentación ya que bajo condición de ayuno no disminuyeron la expresión de factores de transcripción relacionados con la lipogénesis, Pparg y Srebf1, a pesar de estar en una situación de demanda energética. Por otra parte presentaron reducida capacidad lipolítica lo que podría explicar la menor reducción del tamaño en los depósitos de grasa que muestran estos animales bajo condiciones de ayuno en comparación con los controles, también bajo condición de ayuno presentaron una alteración para la movilización las reservas lipídicas debido a la reducción en la expresión de Cidea y de ATGL. Estas alteraciones metabólicas en TAB de crías alimentadas con dieta de cafetería pueden contribuir a una

gran acumulación de grasa y como se presentan a edades tempranas podría tener más relevancia en el desarrollo de patologías relacionadas con la obesidad en edad adulta. La exposición durante un periodo corto con dieta de cafetería en ratas jóvenes afecta el metabolismo hepático: el hígado sufre adaptaciones moleculares aparentemente dirigidas a mantener la homeostasis energética bajo este estrés dietético, principalmente se produce una disminución en la expresión de genes lipogénicos y el incremento en los niveles de expresión de genes relacionados con la oxidación de ácidos grasos. (Capítulo 1).

La obesidad materna representa un foco de atención por su implicación en complicaciones metabólicas tanto para la madre como para el recién nacido (Wang, Davies et al. 2002; Bellver, Rossal et al. 2003; McIntyre, Gibbons et al. 2012). Existen algunos estudios que recomiendan tener un índice de masa corporal (IMC) en rangos normales antes del embarazo. Se ha sugerido que el perder peso antes del embarazo previene las complicaciones asociadas a la obesidad materna durante la gestación (Glazer, Hendrickson et al. 2004; Getahun, Ananth et al. 2007; Ehrlich, Hedderson et al. 2011). No obstante, la vigilancia metabólica de niños que han nacido después de una pérdida de peso materno antes del embarazo es aun escasa. Si bien parece que existen indicios de que una pérdida de peso en mujeres obesas antes de la concepción puede suponer beneficios tanto para la salud materna como para la de la descendencia, no existe un conceso global en las estrategias que deben seguir las mujeres para esta pérdida de peso antes del embarazo. El principal problema estaría en que habría que evitar periodos de balance energético negativo durante las etapas iniciales de la gestación. Si bien es verdad que la sobre alimentación y la obesidad materna durante la gestación pueden tener consecuencias en la salud metabólica de la descendencia, una restricción calórica durante las etapas iniciales de la gestación también produce adaptaciones metabólicas que predisponen a la descendencia a un mayor desarrollo de obesidad. Por tanto, es necesario más estudios para determinar los efectos beneficiosos de la pérdida de peso materno antes de la gestación, evitando los riesgos asociados tanto a la obesidad materna como a la restricción calórica durante la gestación (Zhang, Rattanatray et al. 2011; Matusiak, Barrett et al. 2014).

Desarrollamos un modelo de obesidad inducida por dieta de cafetería (modelo postcafetería), al que un mes antes de la gestación eliminamos la dieta obesogénica. Para ello, trabajamos con ratas Wistar hembra, las cuales fueron alimentadas con una dieta de cafetería (además de tener libre acceso al pienso estándar) desde el día 10 hasta el día 100 de vida y a partir de entonces sólo con pienso estándar. Paralelamente se siguieron hembras de la misma edad alimentadas con dieta control. Un mes después de la retirada de la dieta de cafetería las ratas hembra del grupo control y postcafetería fueron apareadas con machos controles (día 130). Analizamos los efectos de la reversión de la dieta obesogénica antes del apareamiento sobre la composición de la leche y en el peso y composición corporal de la descendencia. Como era de esperar, las ratas alimentadas con dieta de cafetería presentaron un rápido incremento de peso en comparación con los animales control, este aumento se debe en parte a la elevada acumulación de los depósitos de grasa, lo que confirma las propiedades obesogénicas de la dieta de cafetería (Pico, Pons et al. 1991; Akyol, McMullen et al. 2012; Oliver, Reynes et al. 2013). Un mes antes del apareamiento las ratas postcafetería fueron alimentadas con dieta control. Durante este periodo se pudo observar una disminución en el peso corporal de las ratas que previamente habían sido alimentadas con una dieta de cafetería. Esta disminución se debe, en parte, a la menor ingesta que se observa en estos animales, así como a un efecto del valor hedónico de los alimentos. La menor

ingesta de alimentos de las madres del grupo postcafetería comparado con las madres control, se mantuvieron durante la gestación y hasta el final del periodo de lactancia. A pesar de la menor ingesta que presentan las madres del grupo postcafetería con respecto a las controles, los efectos de la dieta de cafetería no llegan a ser completamente revertidos, ya que los niveles de grasa corporal de las ratas postcafetería, aunque se produzca una reducción de peso y grasa corporal después de consumir durante 30 días una dieta control, siguen siendo mayores que el grupo control. De hecho, los niveles de grasa corporal siguen siendo mayores en las madres postcafetería hasta el final de la lactancia, además de presentar niveles de leptina en suero más elevados que en las controles. La mayor adiposidad en las madres postcafetería también estuvo correlacionada con mayores niveles de leptina y adiponectina en leche, no así en los niveles de irisina que al parecer no dependen del grado de adiposidad materno. Existen numerosas evidencias, tanto en humanos como en ratas, del papel de la leptina, como componente de la leche materna, en la futura prevención del desarrollo de obesidad en la edad adulta. En niños, los niveles de leptina en leche están negativamente correlacionados con el incremento de índice de masa corporal durante los primeros meses de vida (Doneray, Orbak et al. 2009; Schuster, Hechler et al. 2011) e incluso con la ganancia de peso corporal hasta los 2 años de edad (Miralles, Sanchez et al. 2006). A la edad de 4 meses las crías de madres postcafetería, tanto machos como hembras, tienen una menor ganancia de peso corporal en comparación con las crías de madres control, sugiriendo que las crías de madres del grupo postcafetería presentan resistencia frente a la ganancia de peso. No obstante, no presentan alteraciones ni en el porcentaje de grasa corporal ni en los parámetros sanguíneos, tanto en condiciones de alimentación como en ayuno. Por tanto, nuestro estudio parece indicar, que la eliminación de la dieta obesogénica antes del embarazo, sustituyéndola por una dieta control, baja en grasa, previene los efectos negativos de la obesidad materna en la descendencia. Además, un factor fundamental que puede participar de manera importante en la prevención de la ganancia de peso corporal de las crías de madres postcafetería, son los altos niveles de leptina en leche materna que presentaron las madres postcafetería. Por tanto, las crías de madres postcafetería podrían haber estado expuestas a una mayor ingesta de leptina durante la lactancia, en comparación con las crías de madres control, y podría condicionar la prevención de la ganancia de peso corporal de las crías. (Capítulo 2).

Quisimos ver también el efecto de la eliminación de la dieta obesogénica antes del embarazo sobre crías a edad temprana, 26 días de edad, 5 días tras el destete y analizar si dichos efectos podían mantenerse en edad adulta aún después de estar expuestos a un ambiente obesogénico. A temprana edad observamos que las crías de madres postcafetería presentaron durante la lactancia un menor peso corporal que las crías de madres control que se mantuvo hasta el destete en los machos y hasta día 11 en las hembras, este mismo efecto protector se veía después de hacer un seguimiento más a largo plazo, se seguía manteniendo hasta los 4 meses, incluso se mantuvo hasta etapas adultas en ratas de 6 meses, que después de estar expuestas a una western diet durante 2 meses presentaron una menor ganancia de peso corporal y menor adiposidad. (Capítulo 3 y Capítulo 4). En este sentido, Zambrano et al, también han descrito que los efectos de la obesidad materna sobre la descendencia son reversibles, en términos de peso y adiposidad corporal y resistencia a la insulina, con el cambio a una dieta no obesogénica antes de la gestación, (Zambrano, Martinez-Samayoa et al. 2010). Por el contrario, la exposición a un ambiente obesogéncio durante el periodo de peri-concepción o durante la gestación y la lactancia están relacionados con una mayor programación de padecer obesidad en la edad adulta (Langley-Evans 1996; Langley-Evans 1999; Dahlhoff, Pfister et al. 2014).

A edades tempranas pudimos observar que no existió alteración en el mecanismo de regulación durante el ayuno ya que las crías de madres postcafetería responden igual que las crías de madres control. En etapas adultas la glucemia también fue normal, en condiciones tanto de alimentación *ad libitum* como en ayuno, tanto en crías de madres control como en crías de madres postcafetería tras 1os 2 meses de la ingesta de la dieta *western diet*. Por lo tanto podríamos asumir que la restricción energética antes del embarazo posiblemente regula la respuesta al ayuno en crías de madres postcafetería.

En hipotálamo y a edades tempranas observamos que en los niveles de expresión del principal neuropéptido orexigénico (Npy) y el principal neuropéptido anorexigénico (Pomc) y de otros genes relacionados con la señalización de la leptina y la grhelina (Ghsr, Socs3, Stat3), en respuesta a la condición de alimentación ad libitum o ayuno son similares en crías de madres postcafetería y control lo que sugiere que no existe alteración alguna en el control de la ingesta energética a nivel hipotalámico. Sin embargo es importante mencionar que los niveles de expresión de estos dos neuropéptidos y de Ghsr, Socs3, Stat3 son menores en el grupo postcafetería en comparación con el grupo control. Curiosamente, a la edad de 6 meses, los machos de madres postcafetería alimentados con western diet presentaron también menores niveles de expresión de Npy, lo que puede estar relacionado con la menor ingesta energética observada en estos animales, comparado con las crías de madres control alimentadas también con western diet. Este resultado podría explicar la menor acumulación de grasa y peso corporal así como menor peso de los diferentes tejidos adiposos en esta etapa adulta. Por tanto, la programación de la menor expresión de Npy, ya desde etapas tempranas en las crías macho de madres postcafetería podría ser uno de los mecanismos de programación metabólica temprana por el que las crías macho de madres postcafetería presentan una menor ingesta y una protección frente a la ganancia de peso y adiposidad corporal en la edad adulta. (Capítulo 3 y Capítulo 4)

En hígado y TAB en edades tempranas la respuesta metabólica en la expresión de los principales genes implicados en el metabolismo lipídico (captación y oxidación de ácidos grasos, lipogénesis, lipolisis) así como el metabolismo de la glucosa y la señalización de leptina e insulina en estos tejidos fue similar en crías de madres postcafetería y controles, tanto en crías hembra como macho. Al igual que como ocurrió en hipotálamo nos interesó ver si existía algún efecto metabólico que se mantuviera hasta edad adulta, por ello analizamos la respuesta metabólica de animales de 6 meses de edad expuestos a una dieta obesogénica. Las crías macho de madres postcafetería alimentados con western diet expresan, en el hígado, menores niveles de genes lipogénicos comparados con los animales de madres control también alimentados con western diet, que podrían proteger frente a la acumulación de lípidos hepáticos que se observa en crías de madres control pero no en las crías de madres postcafetería. Por tanto, la reversión de la dieta de cafetería en hembras obesas un mes antes de la gestación, previene de predisposición a alteraciones metabólicas, a nivel hepático, que se producen en descendientes de madres obesas.

Un resultado importante observado en TAB retroperitoneal en etapas tempranas fue una menor expresión de genes lipogénicos y lipolíticos en machos en las crías de madres postcafetería, lo que nos planteó la posibilidad de que en edad adulta estas crías pudieran tener afectada su salud metabólica. La expresión génica de genes implicados en el metabolismo lipídico en el tejido adiposo retroperitoneal en la edad adulta, sugiere que las crías macho de madres postcafetería responden de manera diferente a la western diet, comparado con las cría de madres control. Las crías macho de madres postcafetería presentan una disminución en expresión de genes relacionados con la lipogénesis

lipolisis, y de la oxidación de ácidos grasos. La menor ingesta, junto con la menor activación de la lipogénesis en el tejido adiposo, podría explicar, la menor acumulación de grasa observada en las crías de madres postcafetería. Además, a los 6 meses d edad observamos una disminución en la expresión de Mest y de leptina en el TAB retroperitoneal, así como los niveles circulantes de leptina, en los machos de madres postcafetería. Recientemente, se ha propuesto que la expresión del gen de la leptina y Mest en tejido adiposo blanco son marcadores predictivos de la expansión del tejido adiposo (Voigt, Ribot et al. 2015). Estos resultados podrían indicar una posible marca de programación metabólica que ya podíamos observar a edades tempranas. (Capítulo 3 y Capítulo 4)

CONCLUSIONES

6. Conclusiones

- 1. La ingesta de una dieta de cafetería durante un periodo corto en etapas tempranas en ratas es suficiente para alterar la respuesta metabólica a los cambios en las condiciones de alimentación y ayuno en órganos clave del metabolismo energético, particularmente en tejido adiposo, además de producir una hiperfagia y una gran acumulación de grasa corporal, y todo ello a pesar de que no se observan diferencias en el peso corporal
- 2. La reversión desde una dieta de cafetería en ratas obesas a una dieta estándar, un mes antes de la gestación, puede prevenir los efectos perjudiciales de la obesidad materna en las crías o incluso mejorar la salud. El efecto beneficioso de la recuperación de un patrón de alimentación normal se produce aunque no se consiga una reversión completa del exceso de peso y adiposidad materna. Esta mayor protección de las crías de madres postcafetería frente al aumento de peso corporal y la acumulación de grasa en etapas adultas, puede estar relacionado con una mayor ingesta de leptina durante el periodo de lactancia.
- 3. Los efectos a edad temprana del cambio de la dieta de cafetería por la dieta estándar un mes antes de la gestación en madres con obesidad dietética, puede evitar los efectos perjudiciales del exceso de grasa en las madres sobre el metabolismo lipídico de sus crías.
- 4. La sustitución de la dieta de cafetería en ratas con obesidad dietética un mes antes del embarazo, genera un efecto protector en la descendencia que se manifiesta en edad adulta con una menor ganancia de peso, menor acumulación de grasa, menor hiperfagia y menor acumulación de lípidos en el hígado, incluso con la exposición a un ambiente obesogénico.
- 5. Esta menor adiposidad puede en parte explicarse por la menor expresión de genes lipogénicos que se observa en machos de madres postcafetería alimentados con *western diet*. El hecho que las crías macho de madres postcafetería mostraran, ya en edades tempranas una menor expresión de genes lipogénicos en el tejido adiposo blanco retroperitoneal, sugiere la existencia de un efecto de programación metabólica, ya presente en edades tempranas y que se manifiesta claramente en la edad adulta ante una dieta obesogénica.
- 6. La menor expresión hipotalámica del neuropéptido orexigénico NPY, observada en los descendientes macho de madres postcafetería cuando son adultos, y que ya se observaba en etapas tempranas, se explicaría por cambios en la programación metabólica originados por la sustitución de la dieta obesogénica en las madres antes del embarazo. Este cambio en la programación metabólica implicaría al Npy en una mejor regulación de la ingesta energética y que podría verse reflejado en la edad adulta. Así, las crías de madres postcafetería tienen una menor ingesta calórica, incluso cuando han sido expuestos a una dieta apetecible y alta en grasas y sacarosa como la western diet.
- 7. Los descendientes macho de madres postcafetería alimentados con western diet en la edad adulta acumulan menos lípidos en el hígado, lo que podría explicarse por la menor activación de la expresión de genes relacionados con la lipogénesis hepática que se observa en estos animales, comparados con las crías adultas de madres control.

REFERENCIAS

7. Referencias

- Abella, V., Scotece M., et al. (2014). "Adipokines, metabolic syndrome and rheumatic diseases." J Immunol Res **2014**: 343746.
- Accuckek. "https://www.accuchek.es/documents/Manual_Accu-Chek_Aviva.pdf."
- Agostoni, C. (2005). "Ghrelin, leptin and the neurometabolic axis of breastfed and formula-fed infants." Acta Paediatr **94**(5): 523-525.
- Ahima, R. S. (2006). "Adipose tissue as an endocrine organ." Obesity (Silver Spring) **14 Suppl 5**: 242S-249S.
- Ahima, R. S. and Flier J. S. (2000). "Leptin." Annual review of physiology 62: 413-437.
- Ahima, R. S., Prabakaran D., et al. (1996). "Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting." Nature **382**(6588): 250-252.
- Ahrens, W., Bammann K., et al. (2006). "Understanding and preventing childhood obesity and related disorders--IDEFICS: a European multilevel epidemiological approach." <u>Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD</u> **16**(4): 302-308.
- Akyol, A., McMullen S., et al. (2012). "Glucose intolerance associated with early-life exposure to maternal cafeteria feeding is dependent upon post-weaning diet." The British journal of nutrition **107**(7): 964-978.
- Alfaradhi, M. Z. and Ozanne S. E. (2011). "Developmental programming in response to maternal overnutrition." Front Genet 2: 27.
- Arenz, S., Ruckerl R., et al. (2004). "Breast-feeding and childhood obesity--a systematic review." Int J Obes Relat Metab Disord **28**(10): 1247-1256.
- Armitage, J. A., Taylor P. D., et al. (2005). "Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy rich diet during development." The Journal of physiology **565**(Pt 1): 3-8.
- Armstrong, J., Reilly J. J., et al. (2002). "Breastfeeding and lowering the risk of childhood obesity." <u>Lancet</u> **359**(9322): 2003-2004.
- Aydin, S., Kuloglu T., et al. (2013). "Copeptin, adropin and irisin concentrations in breast milk and plasma of healthy women and those with gestational diabetes mellitus." Peptides **47**: 66-70.
- Barker, D. J. (1990). "The fetal and infant origins of adult disease." <u>BMJ</u> **301**(6761): 1111.
- Barker, D. J., Eriksson J. G., et al. (2002). "Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis." <u>International journal of epidemiology</u> **31**(6): 1235-1239.
- Barrenetxe, J., Villaro A. C., et al. (2002). "Distribution of the long leptin receptor isoform in brush border, basolateral membrane, and cytoplasm of enterocytes." <u>Gut</u> **50**(6): 797-802.
- Bayol, S. A., Farrington S. J., et al. (2007). "A maternal 'junk food' diet in pregnancy and lactation promotes an exacerbated taste for 'junk food' and a greater propensity for obesity in rat offspring." The British journal of nutrition **98**(4): 843-851.

- Bayol, S. A., Simbi B. H., et al. (2008). "Offspring from mothers fed a 'junk food' diet in pregnancy and lactation exhibit exacerbated adiposity that is more pronounced in females." <u>The Journal of physiology</u> **586**(13): 3219-3230.
- Bayol, S. A., Simbi B. H., et al. (2010). "A maternal "junk food" diet in pregnancy and lactation promotes nonalcoholic Fatty liver disease in rat offspring." Endocrinology **151**(4): 1451-1461.
- Bayol, S. A., Simbi B. H., et al. (2005). "A maternal cafeteria diet during gestation and lactation promotes adiposity and impairs skeletal muscle development and metabolism in rat offspring at weaning." The Journal of physiology **567**(Pt 3): 951-961.
- Beltowski, J. (2003). "Adiponectin and resistin--new hormones of white adipose tissue."

 <u>Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research 9(2): RA55-61.</u>
- Bellver, J., Rossal L. P., et al. (2003). "Obesity and the risk of spontaneous abortion after oocyte donation." <u>Fertil Steril</u> **79**(5): 1136-1140.
- Benoit, S. C., Kemp C. J., et al. (2009). "Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC-theta subcellular localization in rodents." <u>The Journal</u> of clinical investigation **119**(9): 2577-2589.
- Berthoud, H. R. (2011). "Metabolic and hedonic drives in the neural control of appetite: who is the boss?" Current opinion in neurobiology **21**(6): 888-896.
- Berthoud, H. R. (2012). "The neurobiology of food intake in an obesogenic environment." The Proceedings of the Nutrition Society **71**(4): 478-487.
- Black, R. E., Victora C. G., et al. (2013). "Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries." <u>Lancet</u> **382**(9890): 427-451.
- Bochukova, E. G., Huang N., et al. (2010). "Large, rare chromosomal deletions associated with severe early-onset obesity." Nature **463**(7281): 666-670.
- Bonet, M. L., Oliver P., et al. (2013). "Pharmacological and nutritional agents promoting browning of white adipose tissue." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1831**(5): 969-985.
- Bonnet, M., Delavaud C., et al. (2002). "Mammary leptin synthesis, milk leptin and their putative physiological roles." Reprod Nutr Dev **42**(5): 399-413.
- Bonomini, F., Rodella L. F., et al. (2015). "Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress." <u>Aging Dis</u> **6**(2): 109-120.
- Boren, J., Taskinen M. R., et al. (2013). "Ectopic lipid storage and insulin resistance: a harmful relationship." Journal of internal medicine **274**(1): 25-40.
- Borengasser, S. J., Zhong Y., et al. (2013). "Maternal obesity enhances white adipose tissue differentiation and alters genome-scale DNA methylation in male rat offspring." <u>Endocrinology</u> **154**(11): 4113-4125.
- Bostrom, P., Wu J., et al. (2012). "A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis." <u>Nature</u> **481**(7382): 463-468.
- Brabant, G., Nave H., et al. (2002). "Secretion of free and protein-bound leptin from subcutaneous adipose tissue of lean and obese women." <u>J Clin Endocrinol Metab</u> **87**(8): 3966-3970.

- Brisbois, T. D., Farmer A. P., et al. (2012). "Early markers of adult obesity: a review."

 <u>Obesity reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity</u> **13**(4): 347-367.
- Broberger, C., Johansen J., et al. (1998). "The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice." <u>Proceedings of the National Academy of Sciences of</u> the United States of America **95**(25): 15043-15048.
- Bronsky, J., Karpisek M., et al. (2006). "Adiponectin, adipocyte fatty acid binding protein, and epidermal fatty acid binding protein: proteins newly identified in human breast milk." Clin Chem **52**(9): 1763-1770.
- Bruce, K. D., Cagampang F. R., et al. (2009). "Maternal high-fat feeding primes steatohepatitis in adult mice offspring, involving mitochondrial dysfunction and altered lipogenesis gene expression." <u>Hepatology</u> **50**(6): 1796-1808.
- Brunton, P. J. and Russell J. A. (2008). "The expectant brain: adapting for motherhood." Nat Rev Neurosci 9(1): 11-25.
- Buckley, A. J., Keseru B., et al. (2005). "Altered body composition and metabolism in the male offspring of high fat-fed rats." <u>Metabolism: clinical and experimental</u> **54**(4): 500-507.
- Cai, D. and Liu T. (2012). "Inflammatory cause of metabolic syndrome via brain stress and NF-kappaB." Aging (Albany NY) 4(2): 98-115.
- Caimari, A., Oliver P., et al. (2007). "Regulation of adiponutrin expression by feeding conditions in rats is altered in the obese state." <u>Obesity (Silver Spring)</u> **15**(3): 591-599.
- Caimari, A., Oliver P., et al. (2010). "Feeding conditions control the expression of genes involved in sterol metabolism in peripheral blood mononuclear cells of normoweight and diet-induced (cafeteria) obese rats." J Nutr Biochem 21(11): 1127-1133.
- Canto, C. and Auwerx J. (2010). "AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways." <u>Cellular and molecular life sciences: CMLS</u> **67**(20): 3407-3423.
- Casabiell, X., Pineiro V., et al. (1997). "Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake." <u>J Clin Endocrinol Metab</u> **82**(12): 4270-4273.
- Catalano, P. M. and Ehrenberg H. M. (2006). "The short- and long-term implications of maternal obesity on the mother and her offspring." <u>BJOG</u>: an international journal of obstetrics and gynaecology **113**(10): 1126-1133.
- Cesur, G., Ozguner F., et al. (2012). "The relationship between ghrelin and adiponectin levels in breast milk and infant serum and growth of infants during early postnatal life." The journal of physiological sciences: JPS 62(3): 185-190.
- Cinti, S., de Matteis R., et al. (2001). "Leptin in the human stomach." Gut 49(1): 155.
- Clausen, T. D., Mathiesen E. R., et al. (2008). "High prevalence of type 2 diabetes and pre-diabetes in adult offspring of women with gestational diabetes mellitus or type 1 diabetes: the role of intrauterine hyperglycemia." <u>Diabetes Care</u> **31**(2): 340-346.
- Coll, A. P. (2007). "Effects of pro-opiomelanocortin (POMC) on food intake and body weight: mechanisms and therapeutic potential?" <u>Clinical science</u> **113**(4): 171-182.

- Coll, A. P. and Yeo G. S. (2013). "The hypothalamus and metabolism: integrating signals to control energy and glucose homeostasis." <u>Current opinion in pharmacology</u> **13**(6): 970-976.
- Considine, R. V., Sinha M. K., et al. (1996). "Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans." <u>The New England journal</u> of medicine **334**(5): 292-295.
- Christian, P. (2010). "Micronutrients, birth weight, and survival." <u>Annual review of nutrition</u> **30**: 83-104.
- Dahlhoff, M., Pfister S., et al. (2014). "Peri-conceptional obesogenic exposure induces sex-specific programming of disease susceptibilities in adult mouse offspring." Biochimica et biophysica acta **1842**(2): 304-317.
- Daniels, S. R., Arnett D. K., et al. (2005). "Overweight in children and adolescents: pathophysiology, consequences, prevention, and treatment." <u>Circulation</u> **111**(15): 1999-2012.
- De la Torre, A. M. (2004). <u>Nutrición y metabolismo en trastornos de la conducta</u> alimentaria, Glosa.
- Debes, A. K., Kohli A., et al. (2013). "Time to initiation of breastfeeding and neonatal mortality and morbidity: a systematic review." <u>BMC Public Health</u> **13 Suppl 3**: S19.
- Desai, M., Beall M., et al. (2013). "Developmental origins of obesity: programmed adipogenesis." <u>Curr Diab Rep</u> **13**(1): 27-33.
- Diraison, F., Dusserre E., et al. (2002). "Increased hepatic lipogenesis but decreased expression of lipogenic gene in adipose tissue in human obesity." <u>American journal of physiology. Endocrinology and metabolism</u> **282**(1): E46-51.
- Donath, S. M. and Amir L. H. (2000). "Does maternal obesity adversely affect breastfeeding initiation and duration?" <u>Journal of paediatrics and child health</u> **36**(5): 482-486.
- Doneray, H., Orbak Z., et al. (2009). "The relationship between breast milk leptin and neonatal weight gain." <u>Acta paediatrica</u> **98**(4): 643-647.
- Drackley, J. K. (1999). "ADSA Foundation Scholar Award. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier?" <u>Journal of dairy science</u> **82**(11): 2259-2273.
- Drackley JK, D. H., Douglas GN, Guretzky NAJ, Litherland NB, Underwood JP, et al. (2005). "Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders." <u>Ital J Anim Sci.</u>
- Eberle, D., Hegarty B., et al. (2004). "SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis." <u>Biochimie</u> **86**(11): 839-848.
- Ehrlich, S. F., Hedderson M. M., et al. (2011). "Change in body mass index between pregnancies and the risk of gestational diabetes in a second pregnancy." <u>Obstet Gynecol</u> **117**(6): 1323-1330.
- Elahi, M. M., Cagampang F. R., et al. (2009). "Long-term maternal high-fat feeding from weaning through pregnancy and lactation predisposes offspring to hypertension, raised plasma lipids and fatty liver in mice." The British journal of nutrition **102**(4): 514-519.
- Elias, C. F., Lee C., et al. (1998). "Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord." <u>Neuron</u> **21**(6): 1375-1385.

- Esfahani, M., Movahedian A., et al. (2015). "Adiponectin: an adipokine with protective features against metabolic syndrome." <u>Iranian journal of basic medical sciences</u> **18**(5): 430-442.
- Fabbrini, E. and Magkos F. (2015). "Hepatic Steatosis as a Marker of Metabolic Dysfunction." <u>Nutrients</u> **7**(6): 4995-5019.
- Feldeisen, S. E. and Tucker K. L. (2007). "Nutritional strategies in the prevention and treatment of metabolic syndrome." <u>Appl Physiol Nutr Metab</u> **32**(1): 46-60.
- Ferre, P. and Foufelle F. (2007). "SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: clinical perspective." Hormone research **68**(2): 72-82.
- Flint, D. J., Travers M. T., et al. (2005). "Diet-induced obesity impairs mammary development and lactogenesis in murine mammary gland." <u>American journal of physiology</u>. Endocrinology and metabolism **288**(6): E1179-1187.
- Folch, J., Lees M., et al. (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." J Biol Chem **226**(1): 497-509.
- Foretz, M., Pacot C., et al. (1999). "ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose." Molecular and cellular biology **19**(5): 3760-3768.
- Gabriely, I., Ma X. H., et al. (2002). "Removal of visceral fat prevents insulin resistance and glucose intolerance of aging: an adipokine-mediated process?" <u>Diabetes</u> **51**(10): 2951-2958.
- Garcia, A. P., Palou M., et al. (2010). "Moderate caloric restriction during gestation results in lower arcuate nucleus NPY- and alphaMSH-neurons and impairs hypothalamic response to fed/fasting conditions in weaned rats." <u>Diabetes</u>, obesity & metabolism 12(5): 403-413.
- Garcia, A. P., Palou M., et al. (2011). "Moderate caloric restriction during gestation in rats alters adipose tissue sympathetic innervation and later adiposity in offspring." PLoS One 6(2): e17313.
- Gavrila, A., Chan J. L., et al. (2003). "Serum adiponectin levels are inversely associated with overall and central fat distribution but are not directly regulated by acute fasting or leptin administration in humans: cross-sectional and interventional studies." J Clin Endocrinol Metab **88**(10): 4823-4831.
- Getahun, D., Ananth C. V., et al. (2007). "Primary preeclampsia in the second pregnancy: effects of changes in prepregnancy body mass index between pregnancies." Obstet Gynecol **110**(6): 1319-1325.
- Giralt, M. and Villarroya F. (2013). "White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions?" Endocrinology **154**(9): 2992-3000.
- Glazer, N. L., Hendrickson A. F., et al. (2004). "Weight change and the risk of gestational diabetes in obese women." <u>Epidemiology</u> **15**(6): 733-737.
- Goodman, M. N., Larsen P. R., et al. (1980). "Starvation in the rat. II. Effect of age and obesity on protein sparing and fuel metabolism." The American journal of physiology **239**(4): E277-E286.
- Gosmain, Y., Dif N., et al. (2005). "Regulation of SREBP-1 expression and transcriptional action on HKII and FAS genes during fasting and refeeding in rat tissues." <u>Journal of lipid research</u> **46**(4): 697-705.
- Gregorio, B. M., Souza-Mello V., et al. (2010). "Maternal high-fat intake predisposes nonalcoholic fatty liver disease in C57BL/6 offspring." <u>American journal of obstetrics and gynecology</u> **203**(5): 495 e491-498.

- Gualillo, O., Eiras S., et al. (2000). "Elevated serum leptin concentrations induced by experimental acute inflammation." <u>Life Sci</u> **67**(20): 2433-2441.
- Guo, F. and Jen K. L. (1995). "High-fat feeding during pregnancy and lactation affects offspring metabolism in rats." <u>Physiology & behavior</u> **57**(4): 681-686.
- Hahn, T. M., Breininger J. F., et al. (1998). "Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons." <u>Nature neuroscience</u> **1**(4): 271-272.
- Hamed, E. A., Zakary M. M., et al. (2011). "Circulating leptin and insulin in obese patients with and without type 2 diabetes mellitus: relation to ghrelin and oxidative stress." <u>Diabetes Res Clin Pract</u> **94**(3): 434-441.
- Hardie, D. G. (2007). "AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy." Nature reviews. Molecular cell biology **8**(10): 774-785.
- Hardie, D. G., Ross F. A., et al. (2012). "AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis." <u>Nature reviews. Molecular cell biology</u> **13**(4): 251-262.
- Hasenour, C. M., Berglund E. D., et al. (2013). "Emerging role of AMP-activated protein kinase in endocrine control of metabolism in the liver." <u>Molecular and cellular endocrinology</u> **366**(2): 152-162.
- Hashimoto, T., Cook W. S., et al. (2000). "Defect in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-inducible fatty acid oxidation determines the severity of hepatic steatosis in response to fasting." <u>The Journal of biological chemistry</u> **275**(37): 28918-28928.
- Hawkes, J., Bryan D. L., et al. (2004). "Cells from mature human milk are capable of cytokine production following in vitro stimulation." <u>Adv Exp Med Biol</u> **554**: 467-470.
- Hebestreit, A., Bornhorst C., et al. (2014). "Associations between energy intake, daily food intake and energy density of foods and BMI z-score in 2-9-year-old European children." <u>European journal of nutrition</u> **53**(2): 673-681.
- Herz, A. (1998). "Opioid reward mechanisms: a key role in drug abuse?" <u>Canadian</u> journal of physiology and pharmacology **76**(3): 252-258.
- Hilson, J. A., Rasmussen K. M., et al. (1997). "Maternal obesity and breast-feeding success in a rural population of white women." <u>The American journal of clinical nutrition</u> **66**(6): 1371-1378.
- Hoffstedt, J., Arvidsson E., et al. (2004). "Adipose tissue adiponectin production and adiponectin serum concentration in human obesity and insulin resistance." <u>J Clin</u> Endocrinol Metab **89**(3): 1391-1396.
- Hornell, A., Lagstrom H., et al. (2013). "Breastfeeding, introduction of other foods and effects on health: a systematic literature review for the 5th Nordic Nutrition Recommendations." Food Nutr Res 57.
- Hotta, K., Funahashi T., et al. (2000). "Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients." <u>Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology</u> **20**(6): 1595-1599.
- Houseknecht, K. L., McGuire M. K., et al. (1997). "Leptin is present in human milk and is related to maternal plasma leptin concentration and adiposity." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **240**(3): 742-747.
- Hu, E., Liang P., et al. (1996). "AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity." The Journal of biological chemistry **271**(18): 10697-10703.

- Hu, F. B., van Dam R. M., et al. (2001). "Diet and risk of Type II diabetes: the role of types of fat and carbohydrate." <u>Diabetologia</u> **44**(7): 805-817.
- Huh, J. Y., Panagiotou G., et al. (2012). "FNDC5 and irisin in humans: I. Predictors of circulating concentrations in serum and plasma and II. mRNA expression and circulating concentrations in response to weight loss and exercise." <u>Metabolism</u> 61(12): 1725-1738.
- Hulver, M. W., Zheng D., et al. (2002). "Adiponectin is not altered with exercise training despite enhanced insulin action." <u>American journal of physiology</u>. <u>Endocrinology and metabolism</u> **283**(4): E861-865.
- Huntriss, J. D., Hemmings K. E., et al. (2013). "Variable imprinting of the MEST gene in human preimplantation embryos." <u>European journal of human genetics</u>: <u>EJHG</u> **21**(1): 40-47.
- Irving, B. A., Still C. D., et al. (2014). "Does IRISIN Have a BRITE Future as a Therapeutic Agent in Humans?" <u>Curr Obes Rep</u> **3**: 235-241.
- Jacobs, S., Teixeira D. S., et al. (2014). "The impact of maternal consumption of cafeteria diet on reproductive function in the offspring." Physiology & behavior 129: 280-286.
- Jimenez-Chillaron, J. C., Diaz R., et al. (2012). "The role of nutrition on epigenetic modifications and their implications on health." Biochimie **94**(11): 2242-2263.
- Jones, G., Steketee R. W., et al. (2003). "How many child deaths can we prevent this year?" <u>Lancet</u> **362**(9377): 65-71.
- Karatas, Z., Durmus Aydogdu S., et al. (2011). "Breastmilk ghrelin, leptin, and fat levels changing foremilk to hindmilk: is that important for self-control of feeding?" <u>Eur J Pediatr</u> **170**(10): 1273-1280.
- Khan, I., Dekou V., et al. (2004). "Predictive adaptive responses to maternal high-fat diet prevent endothelial dysfunction but not hypertension in adult rat offspring." <u>Circulation</u> **110**(9): 1097-1102.
- Khan, I. Y., Taylor P. D., et al. (2003). "Gender-linked hypertension in offspring of lard-fed pregnant rats." <u>Hypertension</u> **41**(1): 168-175.
- Konieczna, J., Garcia A. P., et al. (2013). "Oral leptin treatment in suckling rats ameliorates detrimental effects in hypothalamic structure and function caused by maternal caloric restriction during gestation." <u>PLoS One</u> **8**(11): e81906.
- Konieczna, J., Sanchez J., et al. (2015). "Blood cell transcriptomic-based early biomarkers of adverse programming effects of gestational calorie restriction and their reversibility by leptin supplementation." <u>Scientific reports</u> 5: 9088.
- Kral, J. G., Biron S., et al. (2006). "Large maternal weight loss from obesity surgery prevents transmission of obesity to children who were followed for 2 to 18 years." <u>Pediatrics</u> **118**(6): e1644-1649.
- Kral, T. V. and Rolls B. J. (2004). "Energy density and portion size: their independent and combined effects on energy intake." Physiology & behavior **82**(1): 131-138.
- Krause, M. V., Mahan L. K., et al. (2005). <u>Nutrición y dietoterapia de Krause</u>, McGraw-Hill Interamericana.

- Krebs, N. F., Himes J. H., et al. (2007). "Assessment of child and adolescent overweight and obesity." <u>Pediatrics</u> **120 Suppl 4**: S193-228.
- Krechowec, S. O., Vickers M., et al. (2006). "Prenatal influences on leptin sensitivity and susceptibility to diet-induced obesity." <u>The Journal of endocrinology</u> **189**(2): 355-363.
- Kristensen, P., Judge M. E., et al. (1998). "Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin." <u>Nature</u> **393**(6680): 72-76.
- Kubota, N., Yano W., et al. (2007). "Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake." <u>Cell Metab</u> **6**(1): 55-68.
- Kurdiova, T., Balaz M., et al. (2014). "Effects of obesity, diabetes and exercise on Fndc5 gene expression and irisin release in human skeletal muscle and adipose tissue: in vivo and in vitro studies." J Physiol **592**(Pt 5): 1091-1107.
- Langley-Evans, S. C. (1996). "Intrauterine programming of hypertension in the rat: nutrient interactions." Comparative biochemistry and physiology. Part A, Physiology 114(4): 327-333.
- Langley-Evans, S. C. (1999). "Fetal origins of adult disease." Br J Nutr 81(1): 5-6.
- Lawlor, D. A., Smith G. D., et al. (2007). "Epidemiologic evidence for the fetal overnutrition hypothesis: findings from the mater-university study of pregnancy and its outcomes." <u>Am J Epidemiol</u> **165**(4): 418-424.
- Lecoutre, S. and Breton C. (2015). "Maternal nutritional manipulations program adipose tissue dysfunction in offspring." Frontiers in physiology 6: 158.
- Leibel, R. L., Rosenbaum M., et al. (1995). "Changes in energy expenditure resulting from altered body weight." <u>The New England journal of medicine</u> **332**(10): 621-628.
- Lepe, M., Bacardi Gascon M., et al. (2011). "Effect of maternal obesity on lactation: systematic review." <u>Nutricion hospitalaria</u> **26**(6): 1266-1269.
- Levine, A. S. and Billington C. J. (1997). "Why do we eat? A neural systems approach." Annual review of nutrition 17: 597-619.
- Li, R., Jewell S., et al. (2003). "Maternal obesity and breast-feeding practices." <u>The</u> American journal of clinical nutrition **77**(4): 931-936.
- Li, Y., Xu S., et al. (2011). "AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice." Cell metabolism 13(4): 376-388.
- Lindholm, C. R., Ertel R. L., et al. (2013). "A high-fat diet decreases AMPK activity in multiple tissues in the absence of hyperglycemia or systemic inflammation in rats." Journal of physiology and biochemistry **69**(2): 165-175.
- Lobstein, T., Baur L., et al. (2004). "Obesity in children and young people: a crisis in public health." <u>Obesity reviews</u>: an <u>official journal of the International Association for the Study of Obesity</u> **5 Suppl 1**: 4-104.
- Lopez-Legarrea, P., de la Iglesia R., et al. (2014). "Higher baseline irisin concentrations are associated with greater reductions in glycemia and insulinemia after weight loss in obese subjects." <u>Nutr Diabetes</u> **4**: e110.
- Lucas, A., Fewtrell M. S., et al. (1999). "Fetal origins of adult disease-the hypothesis revisited." BMJ **319**(7204): 245-249.

- Luna-Luna, M., Medina-Urrutia A., et al. (2015). "Adipose Tissue in Metabolic Syndrome: Onset and Progression of Atherosclerosis." <u>Archives of medical research</u>.
- Llado, I., Pons A., et al. (1999). "Effects of fasting on lipoprotein lipase activity in different depots of white and brown adipose tissues in diet-induced overweight rats." J Nutr Biochem **10**(10): 609-614.
- Llado, I., Proenza A. M., et al. (1991). "Dietary-induced permanent changes in brown and white adipose tissue composition in rats." <u>International journal of obesity</u> **15**(6): 415-419.
- Llopis, M., Sanchez J., et al. (2014). "Maternal fat supplementation during late pregnancy and lactation influences the development of hepatic steatosis in offspring depending on the fat source." <u>Journal of agricultural and food chemistry</u> **62**(7): 1590-1601.
- Maeda, K., Okubo K., et al. (1996). "cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1)." Biochem Biophys Res Commun **221**(2): 286-289.
- Maeda, N., Takahashi M., et al. (2001). "PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein." <u>Diabetes</u> **50**(9): 2094-2099.
- Maffei, M., Halaas J., et al. (1995). "Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects." <u>Nature</u> medicine **1**(11): 1155-1161.
- Martin-Gronert, M. S. and Ozanne S. E. (2013). "Early life programming of obesity." Med Wieku Rozwoj 17(1): 7-12.
- Martin, L. J., Woo J. G., et al. (2006). "Adiponectin is present in human milk and is associated with maternal factors." <u>Am J Clin Nutr</u> **83**(5): 1106-1111.
- Martorell, R., Stein A. D., et al. (2001). "Early nutrition and later adiposity." <u>J Nutr</u> **131**(3): 874S-880S.
- Matamala, J. C., Gianotti M., et al. (1996). "Changes induced by fasting and dietetic obesity in thermogenic parameters of rat brown adipose tissue mitochondrial subpopulations." <u>The Biochemical journal</u> **319** (**Pt 2**): 529-534.
- Matusiak, K., Barrett H. L., et al. (2014). "Periconception weight loss: common sense for mothers, but what about for babies?" <u>J Obes</u> **2014**: 204295.
- McConahy, K. L., Smiciklas-Wright H., et al. (2004). "Portion size of common foods predicts energy intake among preschool-aged children." <u>Journal of the American</u> Dietetic Association **104**(6): 975-979.
- McCurdy, C. E., Bishop J. M., et al. (2009). "Maternal high-fat diet triggers lipotoxicity in the fetal livers of nonhuman primates." J Clin Invest 119(2): 323-335.
- McIntyre, H. D., Gibbons K. S., et al. (2012). "Overweight and obesity in Australian mothers: epidemic or endemic?" Med J Aust 196(3): 184-188.
- Meier, U. and Gressner A. M. (2004). "Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin." Clinical chemistry **50**(9): 1511-1525.
- Milan, G., Granzotto M., et al. (2002). "Resistin and adiponectin expression in visceral fat of obese rats: effect of weight loss." Obesity research **10**(11): 1095-1103.

- Min, X., Lemon B., et al. (2012). "Crystal structure of a single-chain trimer of human adiponectin globular domain." FEBS Lett **586**(6): 912-917.
- Minokoshi, Y., Kim Y. B., et al. (2002). "Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase." <u>Nature</u> **415**(6869): 339-343.
- Miralles, O., Sanchez J., et al. (2006). "A physiological role of breast milk leptin in body weight control in developing infants." Obesity **14**(8): 1371-1377.
- Morrison, C. D., Huypens P., et al. (2009). "Implications of crosstalk between leptin and insulin signaling during the development of diet-induced obesity." <u>Biochimica et biophysica acta</u> **1792**(5): 409-416.
- Muhlhausler, B. and Smith S. R. (2009). "Early-life origins of metabolic dysfunction: role of the adipocyte." <u>Trends in endocrinology and metabolism: TEM</u> **20**(2): 51-57.
- Murabayashi, N., Sugiyama T., et al. (2013). "Maternal high-fat diets cause insulin resistance through inflammatory changes in fetal adipose tissue." <u>European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology</u> **169**(1): 39-44.
- Nielsen, T. S., Jessen N., et al. (2014). "Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease." <u>Journal of molecular endocrinology</u> **52**(3): R199-222.
- Nikonova, L., Koza R. A., et al. (2008). "Mesoderm-specific transcript is associated with fat mass expansion in response to a positive energy balance." <u>FASEB journal</u>: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **22**(11): 3925-3937.
- O'Connor, D., Funanage V., et al. (2003). "Leptin is not present in infant formulas." <u>J</u> <u>Endocrinol Invest</u> **26**(5): 490.
- Oliver, P., Pico C., et al. (2002). "Perinatal expression of leptin in rat stomach." <u>Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists</u> **223**(1): 148-154.
- Oliver, P., Reynes B., et al. (2013). "Peripheral blood mononuclear cells: a potential source of homeostatic imbalance markers associated with obesity development." <u>Pflugers Archiv: European journal of physiology</u> **465**(4): 459-468.
- OMS (2003). "Global Strategy for Infant and Young Child Feeding."
- OMS (2015). "Obesidad y sobrepeso." Nota descriptiva N°311, Enero
- Ostlund, R. E., Jr., Yang J. W., et al. (1996). "Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age, and metabolic covariates." <u>The Journal of clinical endocrinology and metabolism</u> **81**(11): 3909-3913.
- Ozanne, S. E., Olsen G. S., et al. (2003). "Early growth restriction leads to down regulation of protein kinase C zeta and insulin resistance in skeletal muscle." <u>The Journal of endocrinology</u> **177**(2): 235-241.
- Ozarda, Y., Gunes Y., et al. (2012). "The concentration of adiponectin in breast milk is related to maternal hormonal and inflammatory status during 6 months of lactation." Clin Chem Lab Med **50**(5): 911-917.
- Palou, A., Remesar X., et al. (1981). "Metabolic effects of short term food deprivation in the rat." Horm Metab Res **13**(6): 326-330.
- Palou, M., Priego T., et al. (2010). "Sexual dimorphism in the lasting effects of moderate caloric restriction during gestation on energy homeostasis in rats is related with fetal programming of insulin and leptin resistance." <u>Nutrition & metabolism</u> 7: 69.

- Palou, M., Priego T., et al. (2008). "Sequential changes in the expression of genes involved in lipid metabolism in adipose tissue and liver in response to fasting." Pflugers Archiv: European journal of physiology **456**(5): 825-836.
- Palou, M., Sanchez J., et al. (2009). "Induction of NPY/AgRP orexigenic peptide expression in rat hypothalamus is an early event in fasting: relationship with circulating leptin, insulin and glucose." <u>Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology</u> **23**(1-3): 115-124.
- Pedersen, B. K. (2011). "Muscles and their myokines." J Exp Biol 214(Pt 2): 337-346.
- Petrik, J., Reusens B., et al. (1999). "A low protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal rat and is associated with a reduced pancreatic expression of insulin-like growth factor-II." <u>Endocrinology</u> **140**(10): 4861-4873.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9): e45.
- Pharoah, P., Buttfield I. H., et al. (2012). "Neurological damage to the fetus resulting from severe iodine deficiency during pregnancy." <u>International journal of epidemiology</u> **41**(3): 589-592.
- Pico, C., Jilkova Z. M., et al. (2011). "Perinatal programming of body weight control by leptin: putative roles of AMP kinase and muscle thermogenesis." <u>The American journal of clinical nutrition</u> **94**(6 Suppl): 1830S-1837S.
- Pico, C., Oliver P., et al. (2007). "The intake of physiological doses of leptin during lactation in rats prevents obesity in later life." <u>Int J Obes (Lond)</u> **31**(8): 1199-1209.
- Pico, C., Oliver P., et al. (2003). "Gastric leptin: a putative role in the short-term regulation of food intake." The British journal of nutrition **90**(4): 735-741.
- Pico, C., Palou M., et al. (2012). "Metabolic programming of obesity by energy restriction during the perinatal period: different outcomes depending on gender and period, type and severity of restriction." Frontiers in physiology 3: 436.
- Pico, C., Pons A., et al. (1991). "Sustained changes in blood alpha amino nitrogen compartmentation during recovery from cafeteria feeding in rats." <u>Archives internationales de physiologie, de biochimie et de biophysique</u> **99**(4): 345-348.
- Pico, C., Sanchez J., et al. (2002). "Leptin production by the stomach is up-regulated in obese (fa/fa) Zucker rats." Obes Res **10**(9): 932-938.
- Plagemann, A., Harder T., et al. (2000). "Hypothalamic nuclei are malformed in weanling offspring of low protein malnourished rat dams." The Journal of nutrition **130**(10): 2582-2589.
- Postic, C. and Girard J. (2008). "Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice." <u>The Journal of clinical investigation</u> **118**(3): 829-838.
- Priego, T., Sanchez J., et al. (2008). "Sex-differential expression of metabolism-related genes in response to a high-fat diet." <u>Obesity</u> **16**(4): 819-826.
- Proenza, A. M., Llado I., et al. (1992). "Tissue composition in persistent dietary obesity after early and adulthood overfeeding in the rat." <u>Archives internationales de physiologie, de biochimie et de biophysique</u> **100**(2): 147-154.

- Puri, V., Ranjit S., et al. (2008). "Cidea is associated with lipid droplets and insulin sensitivity in humans." <u>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America</u> **105**(22): 7833-7838.
- Rasmussen, K. M., Wallace M. H., et al. (2001). "A low-fat diet but not food restriction improves lactational performance in obese rats." <u>Advances in experimental</u> medicine and biology **501**: 101-106.
- Raynor, H. A. and Epstein L. H. (2001). "Dietary variety, energy regulation, and obesity." <u>Psychological bulletin</u> **127**(3): 325-341.
- Raynor, H. A., Niemeier H. M., et al. (2006). "Effect of limiting snack food variety on long-term sensory-specific satiety and monotony during obesity treatment." Eating behaviors **7**(1): 1-14.
- Reid, L. D. (1985). "Endogenous opioid peptides and regulation of drinking and feeding." The American journal of clinical nutrition **42**(5 Suppl): 1099-1132.
- Remmers, F. and Delemarre-van de Waal H. A. (2011). "Developmental programming of energy balance and its hypothalamic regulation." <u>Endocrine reviews</u> **32**(2): 272-311.
- Ribot, J., Rodriguez A. M., et al. (2008). "Adiponectin and resistin response in the onset of obesity in male and female rats." Obesity 16(4): 723-730.
- Ritchie, L. D. and King J. C. (2000). "Dietary calcium and pregnancy-induced hypertension: is there a relation?" The American journal of clinical nutrition 71(5 Suppl): 1371S-1374S.
- Rkhzay-Jaf, J., O'Dowd J. F., et al. (2012). "Maternal Obesity and the Fetal Origins of the Metabolic Syndrome." <u>Curr Cardiovasc Risk Rep</u> **6**(5): 487-495.
- Roca-Rivada, A., Castelao C., et al. (2013). "FNDC5/irisin is not only a myokine but also an adipokine." PLoS One **8**(4): e60563.
- Rodriguez, A. M., Roca P., et al. (2003). "Positive correlation of skeletal muscle UCP3 mRNA levels with overweight in male, but not in female, rats." <u>American journal of physiology</u>. Regulatory, integrative and comparative physiology **285**(4): R880-888.
- Rolls, B. J. and Rowe E. A. (1982). "Pregnancy and lactation in the obese rat: effects on maternal and pup weights." <u>Physiology & behavior</u> **28**(3): 393-400.
- Rui, L. (2013). "Brain regulation of energy balance and body weight." <u>Reviews in endocrine & metabolic disorders</u> **14**(4): 387-407.
- Rui, L. (2014). "Energy metabolism in the liver." <u>Comprehensive Physiology</u> **4**(1): 177-197.
- Rutishauser, I. H. and Carlin J. B. (1992). "Body mass index and duration of breast feeding: a survival analysis during the first six months of life." <u>Journal of epidemiology and community health</u> **46**(6): 559-565.
- Sabin, M. A. and Kiess W. (2015). "Childhood obesity: Current and novel approaches." Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism **29**(3): 327-338.
- Sala-Vila, A., Castellote A. I., et al. (2005). "Lipid composition in human breast milk from Granada (Spain): changes during lactation." Nutrition **21**(4): 467-473.
- Sanchez, J., Oliver P., et al. (2005). "Leptin orally supplied to neonate rats is directly uptaken by the immature stomach and may regulate short-term feeding." Endocrinology **146**(6): 2575-2582.

- Sanchez, J., Oliver P., et al. (2004). "Diurnal rhythms of leptin and ghrelin in the systemic circulation and in the gastric mucosa are related to food intake in rats." Pflugers Archiv: European journal of physiology **448**(5): 500-506.
- Sanchez, J., Palou A., et al. (2009). "Response to carbohydrate and fat refeeding in the expression of genes involved in nutrient partitioning and metabolism: striking effects on fibroblast growth factor-21 induction." <u>Endocrinology</u> **150**(12): 5341-5350.
- Sanchez, J., Priego T., et al. (2012). "Maternal supplementation with an excess of different fat sources during pregnancy and lactation differentially affects feeding behavior in offspring: putative role of the leptin system." Molecular nutrition & food research 56(11): 1715-1728.
- Sanchez, J., Priego T., et al. (2008). "Oral supplementation with physiological doses of leptin during lactation in rats improves insulin sensitivity and affects food preferences later in life." <u>Endocrinology</u> **149**(2): 733-740.
- Sandoval, D., Cota D., et al. (2008). "The integrative role of CNS fuel-sensing mechanisms in energy balance and glucose regulation." <u>Annual review of physiology</u> **70**: 513-535.
- Savino, F. and Liguori S. A. (2008). "Update on breast milk hormones: leptin, ghrelin and adiponectin." <u>Clin Nutr</u> **27**(1): 42-47.
- Savino, F., Liguori S. A., et al. (2010). "Adipokines in breast milk and preterm infants." <u>Early Hum Dev</u> **86 Suppl 1**: 77-80.
- Scheers, T., Philippaerts R., et al. (2012). "Patterns of physical activity and sedentary behavior in normal-weight, overweight and obese adults, as measured with a portable armband device and an electronic diary." Clin Nutr 31(5): 756-764.
- Scherer, P. E., Williams S., et al. (1995). "A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes." J Biol Chem 270(45): 26746-26749.
- Schneeberger, M., Gomis R., et al. (2014). "Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance." <u>The Journal of endocrinology</u> **220**(2): T25-46.
- Schondorf, T., Maiworm A., et al. (2005). "Biological background and role of adiponectin as marker for insulin resistance and cardiovascular risk." <u>Clin Lab</u> **51**(9-10): 489-494.
- Schuster, S., Hechler C., et al. (2011). "Leptin in maternal serum and breast milk: association with infants' body weight gain in a longitudinal study over 6 months of lactation." Pediatric research **70**(6): 633-637.
- Schwartz, M. W., Baskin D. G., et al. (1996). "Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice." <u>Diabetes</u> **45**(4): 531-535.
- Schwartz, M. W., Seeley R. J., et al. (1997). "Leptin increases hypothalamic proopiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus." <u>Diabetes</u> **46**(12): 2119-2123.
- Schwartz, M. W., Woods S. C., et al. (2000). "Central nervous system control of food intake." Nature **404**(6778): 661-671.
- Seitz, H. J., Muller M. J., et al. (1977). "Coordinate control of intermediary metabolism in rat liver by the insulin/glucagon ratio during starvation and after glucose refeeding. Regulatory significance of long-chain acyl-CoA and cyclic AMP." Archives of biochemistry and biophysics **183**(2): 647-663.

- Shankar, K., Harrell A., et al. (2008). "Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring." <u>American journal of physiology</u>. <u>Regulatory</u>, integrative and comparative physiology **294**(2): R528-538.
- Sipols, A. J., Baskin D. G., et al. (1995). "Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression." Diabetes **44**(2): 147-151.
- Smith-Kirwin, S. M., O'Connor D. M., et al. (1998). "Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk." The Journal of clinical endocrinology and metabolism **83**(5): 1810-1813.
- Smith, J., Cianflone K., et al. (2009). "Effects of maternal surgical weight loss in mothers on intergenerational transmission of obesity." The Journal of clinical endocrinology and metabolism **94**(11): 4275-4283.
- Solinas, G., Boren J., et al. (2015). "De novo lipogenesis in metabolic homeostasis: More friend than foe?" Molecular metabolism **4**(5): 367-377.
- Stephens, T. W., Basinski M., et al. (1995). "The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product." <u>Nature</u> **377**(6549): 530-532.
- Symonds, M. E., Mendez M. A., et al. (2013). "Early life nutritional programming of obesity: mother-child cohort studies." <u>Ann Nutr Metab</u> **62**(2): 137-145.
- Takahashi, M., Kamei Y., et al. (2005). "Mest/Peg1 imprinted gene enlarges adipocytes and is a marker of adipocyte size." <u>American journal of physiology.</u> <u>Endocrinology and metabolism</u> **288**(1): E117-124.
- Tanuma, Y., Tamamoto M., et al. (1975). "The occurrence of brown adipose tissue in perirenal fat in Japanese." <u>Arch Histol Jpn</u> **38**(1): 43-70.
- Taylor, P. D., McConnell J., et al. (2005). "Impaired glucose homeostasis and mitochondrial abnormalities in offspring of rats fed a fat-rich diet in pregnancy."

 <u>American journal of physiology</u>. Regulatory, integrative and comparative physiology **288**(1): R134-139.
- Thornton, J. E., Cheung C. C., et al. (1997). "Regulation of hypothalamic proopiomelanocortin mRNA by leptin in ob/ob mice." Endocrinology **138**(11): 5063-5066.
- Uysal, F. K., Onal E. E., et al. (2002). "Breast milk leptin: its relationship to maternal and infant adiposity." <u>Clin Nutr</u> **21**(2): 157-160.
- Vickers, M. H. (2014). "Early life nutrition, epigenetics and programming of later life disease." <u>Nutrients</u> **6**(6): 2165-2178.
- Vickers, M. H., Breier B. H., et al. (2000). "Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition." <u>American journal of physiology. Endocrinology and metabolism</u> **279**(1): E83-87.
- Vickers, M. H., Gluckman P. D., et al. (2005). "Neonatal leptin treatment reverses developmental programming." <u>Endocrinology</u> **146**(10): 4211-4216.
- Vickers, M. H., Reddy S., et al. (2001). "Dysregulation of the adipoinsular axis -- a mechanism for the pathogenesis of hyperleptinemia and adipogenic diabetes induced by fetal programming." The Journal of endocrinology **170**(2): 323-332.
- Vincent, H. K. and Taylor A. G. (2006). "Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans." Int J Obes (Lond) **30**(3): 400-418.
- Voigt, A., Ribot J., et al. (2015). "Identification of Mest/Peg1 gene expression as a predictive biomarker of adipose tissue expansion sensitive to dietary anti-obesity interventions." Genes & nutrition 10(5): 477.

- Wang, J. X., Davies M. J., et al. (2002). "Obesity increases the risk of spontaneous abortion during infertility treatment." Obes Res 10(6): 551-554.
- Wang, Y. Y., Zhang Z. J., et al. (2011). "[Variation of maternal milk adiponectin and its correlation with infant growth]." Zhonghua Er Ke Za Zhi **49**(5): 338-343.
- Weyer, C., Funahashi T., et al. (2001). "Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia." <u>The Journal of clinical endocrinology and metabolism</u> **86**(5): 1930-1935.
- Weyermann, M., Brenner H., et al. (2007). "Adipokines in human milk and risk of overweight in early childhood: a prospective cohort study." <u>Epidemiology</u> **18**(6): 722-729.
- Whitaker, R. C. (2004). "Predicting preschooler obesity at birth: the role of maternal obesity in early pregnancy." <u>Pediatrics</u> **114**(1): e29-36.
- Whitaker, R. C., Wright J. A., et al. (1997). "Predicting obesity in young adulthood from childhood and parental obesity." N Engl J Med 337(13): 869-873.
- White, C. L., Purpera M. N., et al. (2009). "Maternal obesity is necessary for programming effect of high-fat diet on offspring." <u>American journal of physiology</u>. Regulatory, integrative and comparative physiology **296**(5): R1464-1472.
- Wilson, P. W., D'Agostino R. B., et al. (2005). "Metabolic syndrome as a precursor of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus." <u>Circulation</u> **112**(20): 3066-3072.
- Woo, J. G., Guerrero M. L., et al. (2012). "Human milk adiponectin affects infant weight trajectory during the second year of life." <u>Journal of pediatric gastroenterology and nutrition</u> **54**(4): 532-539.
- Wright, T. M., Fone K. C., et al. (2011). "Exposure to maternal consumption of cafeteria diet during the lactation period programmes feeding behaviour in the rat." <u>International journal of developmental neuroscience</u>: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience **29**(8): 785-793.
- Wu, J., Bostrom P., et al. (2012). "Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human." Cell **150**(2): 366-376.
- Yamauchi, T., Kamon J., et al. (2003). "Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects." <u>Nature</u> **423**(6941): 762-769.
- Yang, W. S., Lee W. J., et al. (2001). "Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin." <u>The Journal of clinical</u> endocrinology and metabolism **86**(8): 3815-3819.
- Yoneda, K., Tomimoto A., et al. (2008). "Expression of adiponectin receptors, AdipoR1 and AdipoR2, in normal colon epithelium and colon cancer tissue." <u>Oncol Rep</u> **20**(3): 479-483.
- Young, S. G. and Zechner R. (2013). "Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis." Genes & development 27(5): 459-484.
- Yu, Z., Han S., et al. (2013). "Pre-pregnancy body mass index in relation to infant birth weight and offspring overweight/obesity: a systematic review and meta-analysis." PLoS One 8(4): e61627.
- Yuan, H. X., Xiong Y., et al. (2013). "Nutrient sensing, metabolism, and cell growth control." Molecular cell **49**(3): 379-387.

- Zambrano, E., Martinez-Samayoa P. M., et al. (2010). "Dietary intervention prior to pregnancy reverses metabolic programming in male offspring of obese rats." The Journal of physiology **588**(Pt 10): 1791-1799.
- Zhang, S., Rattanatray L., et al. (2011). "Maternal obesity and the early origins of childhood obesity: weighing up the benefits and costs of maternal weight loss in the periconceptional period for the offspring." <u>Experimental diabetes research</u> **2011**: 585749.
- Zhang, Y., Proenca R., et al. (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." Nature **372**(6505): 425-432.
- Zhou, Y., Sun X., et al. (2005). "Expression profiles of adiponectin receptors in mouse embryos." Gene Expr Patterns **5**(5): 711-715.
- Zhou, Z., Yon Toh S., et al. (2003). "Cidea-deficient mice have lean phenotype and are resistant to obesity." <u>Nature genetics</u> **35**(1): 49-56.