



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultad de Ciencias

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Estudio de las adaptaciones metabólicas en el hígado durante la lactancia en un modelo animal de obesidad dietética

Mónica Enver Sumaya

Grado de Biología

Año académico 2014-15

DNI de la alumna: 43139378A

Trabajo tutelado per Juana Sánchez Roig
Departamento de Biología Fundamental y Ciencias de la Salud

NO se autoriza la Universidad a incluir mi trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con finalidades exclusivamente académicas y de investigación

Palabras claves del trabajo:
embarazo, lactancia, modelo postcafetería y obesidad

ÍNDICE

RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	5
INTRODUCCIÓN.....	6
- Programación metabólica.....	7
- Obesidad materna en el embarazo y lactancia.....	9
MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
- Obtención del modelo ratas madres postcafetería.....	13
- Aislamiento ARN.....	13
- Cuantificación del ARN y comprobación del estado del ARN purificado.....	14
- Análisis de la expresión génica por RT qPCR).....	15
- Análisis estadístico.....	17
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
CONCLUSIÓN.....	23
AGRADECIMIENTOS.....	23
BIBLIOGRAFÍA.....	23

RESUMEN

Actualmente, la incidencia de la obesidad en las mujeres embarazadas ha aumentado de forma alarmante, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. La obesidad materna implica adaptaciones metabólicas importantes, especialmente a nivel de tejido adiposo y hepático, tanto durante la gestación como en la lactancia. Estas adaptaciones pueden llevar asociadas un mayor riesgo de desarrollar diabetes gestacional y esteatosis hepática, entre otras patologías obstétricas que afectan negativamente al estado de salud de la madre. Por esta razón, se ha estudiado el efecto de la obesidad en la respuesta metabólica del hígado materno comparando el grupo postcafetería (modelo animal de obesidad dietética) con el control. Por ello, se han analizado genes claves relacionados en el metabolismo lipídico, de los cuales se han observado un aumento en la expresión de genes relacionados con la lipogénesis (*Srebf1* y *Fasn*) y una disminución de los genes relacionados con la β -oxidación (*Ppara* y *Cpt1*). Estos resultados parecen indicar un mayor riesgo de desarrollar esteatosis hepática o hígado graso. Además, se ha observado una menor expresión del *LepR* (relacionado con la señalización de la leptina) en el grupo poscafetería que podría estar asociado a una resistencia a la leptina en madres obesas.

ABSTRACT

Nowadays, the impact of obesity among pregnant women has increased alarmingly both in developed and developing countries. Women who are obese during pregnancy and lactation may develop metabolic adaptations, especially in the liver and adipose tissue. These adaptations may be associated with a higher risk to develop gestational diabetes, hepatic steatosis and others disorders which affects negatively mother health. For this reason, we have studied the effect of obesity in the metabolic response of the liver of dams of control and postcafeteria (an animal model of diet induced obesity) group. To that purpose, we analysed key genes related with the lipid metabolism in the liver. In general terms, the expression of genes related to fatty acid synthesis (Srebf1 and Fasn) increased in postcafeteria group compared to control group. Conversely, the expression of genes related to β -oxidation (Ppara and Cpt1a) increased in the postcafeteria group. These results suggest a predisposition to a higher risk for hepatic steatosis in postcafeteria group. Furthermore, postcafeteria dams presented a lower expression of LepR that we could be associated with a higher leptin resistance in this group.

INTRODUCCIÓN

La obesidad es una enfermedad metabólica como consecuencia de una acumulación excesiva de grasa corporal a causa de un desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético. La obesidad es considerada como la epidemia del siglo XXI siendo uno de los problemas de salud pública más graves en países desarrollados (1, 2). De hecho, en el desarrollo de la obesidad intervienen múltiples factores genéticos y ambientales. Entre los factores ambientales, destaca principalmente el consumo de alimentos de gran valor calórico en grandes proporciones y la disminución de actividad física, típica del estilo de vida actual presente en los países desarrollados (3, 4).

El problema más importante asociado a la obesidad es el aumento en el riesgo de padecer diversas enfermedades metabólicas importantes, destacando la diabetes tipo II, dislipemias, hipertensión arterial y enfermedades cardiovasculares (5, 6). El incremento de la tasa de obesidad, especialmente en la población infantil es alarmante, ya que según la Organización Mundial de la Salud (7), se calcula que en 2010 hubo 42 millones de niños menores de 5 años con sobrepeso a nivel mundial, de los cuales 31 millones vivían en países desarrollados (1, 2).

Como consecuencia del incremento de la obesidad en la población general, durante estos últimos años la incidencia de la obesidad entre las mujeres embarazadas ha aumentado también de forma alarmante, tanto en países de desarrollo como en vías de desarrollo. Este hecho es preocupante debido a que mujeres que presentan sobrepeso u obesidad tienen un mayor riesgo de padecer complicaciones durante el embarazo (8). Un factor importante de esta gran incidencia es en parte debido a una dieta rica en grasas que induce cambios metabólicos en los diferentes tejidos involucrados en el control de la homeóstasis energética así como la adaptación fisiológica al aumento de la cantidad de grasa (9–11).

Cabe destacar, que el hígado es uno de los tejidos más importantes en la regulación. La obesidad y el sobrepeso provocan alteraciones importantes en el metabolismo lipídico hepático, afectando notablemente a la β -oxidación, la secreción de lipoproteínas de baja densidad y en la síntesis de ácidos grasos. Debido a estas alteraciones, se produce una acumulación excesiva de lípidos en los hepatocitos y como consecuencia, aumenta el riesgo de desarrollar la enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD) o esteatosis hepática (12).

La gestación y la lactancia son períodos críticos donde, además de que la dieta condiciona el desarrollo del feto durante su vida posnatal y adulta, se producen adaptaciones metabólicas importantes en la madre en función del tipo de alimentos que

ingere en la dieta (13). Cabe destacar que una ingesta de dietas ricas en grasas en ambos períodos puede condicionar el estado de salud tanto de la madre como el del feto (14). Este efecto de las condiciones ambientales durante etapas perinatales en la futura predisposición a enfermedades en la descendencia se conoce como programación metabólica.

Programación metabólica

El concepto de programación metabólica fue sugerido inicialmente por Barker (15). En la teoría del origen fetal de las enfermedades del adulto en la cual se establece la relación de una nutrición pobre en etapas tempranas de la vida y un bajo peso al nacer, con enfermedades cardiovasculares y otros factores de riesgo en el adulto como es la obesidad, hipertensión arterial, resistencia a la insulina y diabetes tipo II. Según esta teoría, como resultado de la desnutrición o restricción calórica durante la gestación, se producen unas adaptaciones en el feto que se tornan permanentes, en el cual, programan una mayor propensión de padecer enfermedades, incluyendo la obesidad, en la edad adulta (16, 17).

Un clásico estudio que confirmaría la teoría propuesta por Barker (18) es el de los efectos de la hambruna holandesa durante la Segunda Guerra Mundial, denominado "*Dutch Famine Birth Cohort Study*". En este estudio se observó una fuerte asociación entre malnutrición y/o desnutrición durante el primer y segundo mes de gestación, enfermedades cardiovasculares y diabetes en la edad adulta. Además, se observó que aquellos individuos expuestos a eventos carenciales in utero padecían una menor tolerancia a los glúcidos y una mayor resistencia insulínica debido a una alteración permanente en las células β del páncreas o a una modificación en la sensibilidad tisular a la insulina que ocurriría durante la vida fetal con una manifestación posterior (10, 16). Sin embargo, en la actualidad la evidencia más sólida o directa que apoya la hipótesis del origen fetal proviene de la experimentación animal demostrando que la desnutrición materna durante el embarazo conduce a enfermedades metabólicas en la descendencia en la edad adulta (19). En experimentos con ratas, se ha observado que una restricción calórica superior al 50% durante la gestación, además de presentar un bajo peso, también se asocia a una mayor incidencia de ser obeso en la edad adulta, particularmente cuando los animales están expuestos a un ambiente hipercalórico (20, 21). Los períodos tempranos de la vida corresponden al período de la diferenciación neuronal en el desarrollo y regulación de vías como la de señalización de la leptina involucradas en la regulación de la homeóstasis energética (22). Conociendo el papel fundamental que realiza el hipotálamo en la regulación homeostática es de esperar que una desnutrición durante la etapa perinatal debido a una restricción calórica, proteica o falta de nutrientes en la dieta materna se asocie a cambios permanentes negativos en la regulación del balance energético y por lo tanto, aumentar la predisposición a la obesidad de cara al futuro (10). Diversos estudios han concluido que ratas expuestas a una restricción calórica durante el embarazo provocan un descenso en el

número de células hipotalámicas en la descendencia, aumentando el riesgo a una resistencia a la insulina y leptina tardía, además de ser responsable de la propensión al sobrepeso (23, 24).

Hasta día de hoy, recientes estudios epidemiológicos y estudios experimentales en animales han demostrado que las influencias ambientales durante el desarrollo fetal, entre ellas la dieta, pueden causar cambios permanentes en la regulación epigenética de los genes y como consecuencia afectar a la salud en la edad adulta (25–27). Se ha observado que la desnutrición materna en ratas induce cambios epigenéticos permanentes en las vías hipotalámicas fetales que regulan el metabolismo, como es la reducción de los niveles de metilación de los promotores del receptor de glucocorticoides (GR) en el hipotálamo fetal, y como consecuencia presentar una desregulación del balance energético (23, 27). En otro estudio donde analizaron el genoma de un conjunto de personas nacidas durante la hambruna holandesa, se encontró unos niveles de metilación significativamente más bajos en un gen relacionado con una hormona de crecimiento vital en la gestación, el gen del factor de crecimiento II- similar a insulina (IGF2- *Insulin like growth factor II*). Debido a la reducción de metilación, aumenta su actividad y por tanto, aumenta los niveles de esta hormona en el organismo asociado a problemas en el desarrollo durante la infancia e incluso a cáncer en la vida adulta (25, 26). Por lo tanto, en individuos nacidos bajo condiciones de hambruna en el embarazo se producen una serie de cambios en los patrones de metilación de su ADN en determinadas regiones génicas asociadas con vías metabólicas importantes que explicarían el incremento en el riesgo de obesidad y diabetes tipo II en la edad adulta (24).

Además de la desnutrición o la restricción calórica durante la gestación, la sobrealimentación puede influir en la susceptibilidad de enfermedades metabólicas en la descendencia en la edad adulta, incluyendo la enfermedad cardiovascular, la diabetes de tipo II, la obesidad, entre otras (ver Figura 1) (28–30).

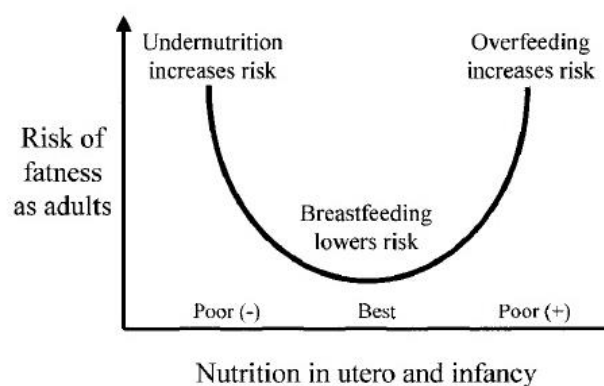


Figura 1. Representación gráfica sobre la hipótesis de la nutrición temprana y riesgo de obesidad en edad adulta. Describe que tanto la desnutrición como la sobrenutrición aumenta el riesgo de presentar enfermedades asociadas a la acumulación de grasa en la descendencia. Adaptado de Martorell, 2001 (30).

Obesidad materna en el embarazo y lactancia

La ingesta de una dieta rica en grasa o la obesidad materna tiene efectos perjudiciales para la descendencia a largo plazo. Además, hay que tener en cuenta que una dieta desequilibrada o la obesidad durante la gestación puede tener consecuencias para la salud metabólica de las madres. Diferentes estudios con roedores han demostrado que la ingesta de una dieta rica en grasa durante el embarazo produce un estado de resistencia a la insulina y una disminución en la sensibilización a la insulina en el cual hay una reducción en la incorporación de glucosa en el tejido adiposo (31–34).

En general, bajo una dieta normolípida durante el embarazo se producen demandas energéticas adicionales en la madre debidas al volumen de proteína y grasa que se requieren para el desarrollo de los tejidos del feto (35). En el inicio de la gestación se produce hiperinsulinemia debido a que se estimula la actividad de las células β del páncreas, y el aumento de la insulina resultante activa la lipogénesis y favorece los depósitos hepáticos de glucógeno. Como resultado de esta situación, en este período se produce un mayor incremento del peso materno (36). En cambio, la gestación avanzada se caracteriza por una resistencia a la acción de la insulina a causa de que el feto tiene una elevada tasa de crecimiento y requiere cantidades importantes de glucosa como sustrato energético (37) y como consecuencia, da como resultado una hiperfagia materna y alteraciones progresivas en cuanto al metabolismo glucídico y lipídico (38, 39).

También se ha visto que en roedores y otras especies de mamíferos, durante los últimos meses del embarazo aumenta de forma progresiva el almacenamiento de los triglicéridos en el hígado y aumenta la concentración de triglicéridos plasmáticos acompañado de un incremento en la lipogénesis (40). Cabe destacar que durante este último período de embarazo, la madre aporta los nutrientes necesarios para el feto incluso en situación de ayuno, mientras que su homeostasis glucídica se mantiene gracias al metabolismo lipídico del hígado y del tejido adiposo (41). Esta situación estimula un aumento del peso corporal juntamente con un incremento del depósito de grasa y del índice de masa magra (38). Además, se produce un aumento significativo de los niveles de leptina e insulina plasmático (42).

En el desarrollo de la resistencia a la insulina al mismo tiempo, se produce un incremento de las concentraciones séricas de las hormonas lactogénicas (prolactina y lactógeno placentario) (43, 44). Diversas hormonas maternas y placentarias actúan conjuntamente para suministrar al feto un abastecimiento metabólico constante (36), estimulando la transcripción del gen de la insulina y la replicación de las células β pancreáticas que conducen a una hiperinsulinemia y resistencia a la insulina presente tanto en la gestación inicial como en la avanzada (45, 46). El lactógeno placentario o somatropina

coriónica humana (hSC) tiene un efecto importante sobre el metabolismo materno durante el último cuatrimestre de embarazo para suministrar al feto el aporte necesario de nutrientes. En concreto, se produce una movilización de los recursos metabólicos en beneficio del desarrollo fetal, induciendo adaptaciones metabólicas específicas en la madre, destacando una reducción de la tolerancia a los glúcidos y el desarrollo de la resistencia a la insulina. Dicha resistencia a la insulina, asociada a una captación defectuosa de la glucosa, dificulta la entrada de glucosa en los tejidos maternos, incluyendo el hígado, el tejido adiposo y el músculo esquelético y, recíprocamente, aumenta la movilización de ácidos grasos y triglicéridos que son empleados como fuentes de energía alternativa para cubrir las necesidades metabólicas de la madre (37) (ver Fig 2). De hecho, la producción de cuerpos cetónicos maternos, obtenidos a partir de la β -oxidación de los ácidos grasos, son usados por la madre, existiendo una mayor propensión de sufrir un estado de cetosis con tal de ahorrar glucosa para el feto (47).

Cabe destacar que la hSC es responsable del desarrollo del estado diabético en la madre asociado al embarazo (diabetes gestacional) con el objetivo de facilitar el crecimiento intrauterino. Al mismo tiempo, se establece una hiperlipidemia progresiva a lo largo de la gestación, juntamente con una síntesis incrementada de triglicéridos en el hígado. Así, se mantiene la glucemia y el transporte de glucosa al feto (47).

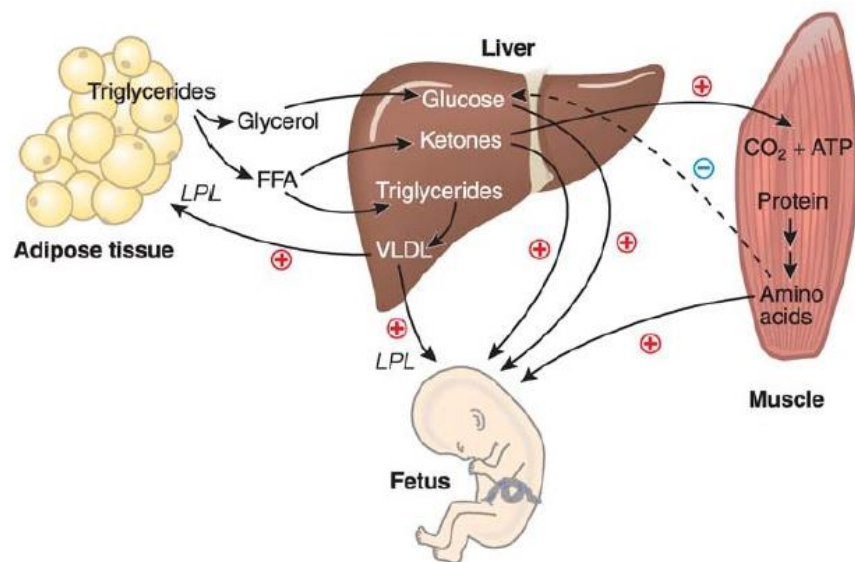


Figura 2. Representación esquemática del efecto que provoca el embarazo en el metabolismo de glúcidos, lípidos y proteínas durante el estado de ayuno. Las flechas marcadas con (+) representan las vías que están incrementadas durante el embarazo y las flechas con (-) representan las vías que están disminuidas. En general, estos cambios metabólicos son más pronunciados en mujeres obesas que en mujeres con normopeso. Adaptado Herrera 1987 (35).

Por otro lado, la obesidad materna durante el embarazo se asocia con una mayor mortalidad y morbilidad tanto en la madre como en la descendencia (48). De esta manera, la obesidad en este período representa un factor importante en cuanto al desarrollo del feto y también de forma adversa sobre la salud materna. Numerosos estudios han demostrado que complicaciones en el parto y patologías obstétricas como son diabetes gestacional, hipertensión arterial, infecciones, hemorragia posparto, muerte y aumento en la tasa de cesáreas están fuertemente relacionados tanto por el exceso de peso materno antes del embarazo, como el incremento de peso durante el mismo (49–51).

Los cambios metabólicos adoptados por una madre que presenta obesidad se ven incrementados de forma exagerada respecto a los cambios metabólicos de una madre con normopeso que se han mencionado anteriormente. Un estudio sugiere que el sobrepeso maternal está asociado al riesgo de padecer hipertensión y diabetes gestacional (52). De hecho, un metanálisis basado en veinte estudios relacionados con obesidad materna durante el embarazo y el riesgo de diabetes gestacional, estima que el riesgo de desarrollar diabetes gestacional es de dos, cuatro y ocho veces mayor entre mujeres con sobrepeso, con obesidad y obesidad severa, respectivamente, comparado con madres embarazadas que presentan normopeso. De este modo, las mujeres con obesidad o sobrepeso durante el embarazo tienen un mayor riesgo de desarrollar diabetes gestacional que las mujeres con normopeso (32). Además, otro estudio observó que la resistencia a la insulina, tanto hepática como periférica, fue mayor en mujeres obesas, en comparación con las mujeres de normopeso, y al mismo tiempo, observó que la sensibilidad a la insulina fue un 40% más bajo en las mujeres obesas (34).

De este modo, el objetivo de nuestro estudio es evaluar las adaptaciones metabólicas durante un período crítico como es la gestación y la lactancia en un modelo de obesidad, concretamente, el modelo de postcafetería. Se estudian los cambios en la expresión de genes claves implicados en el metabolismo lipídico a nivel del hígado comparando las ratas lactantes del modelo postcafetería con las ratas control de la misma edad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del modelo ratas madres postcafetería

El objetivo principal era obtener un modelo animal de obesidad genética y estudiar el efecto de dicha obesidad en la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico en madres del modelo postcafetería tras la gestación y la lactancia. Para ello, se optó por el modelo postcafetería.

El modelo de dieta postcafetería es útil para el estudio de las alteraciones metabólicas que se producen por la obesidad en humanos. La exposición a una dieta cafetería en ratas induce una hiperfagia y un estado de hiperinsulinemia asociado a niveles elevados de colesterol y aumento de peso; como consecuencia de la gran variedad de comida disponible con un contenido elevado de azúcar y grasa, similar a los patrones de dieta actualmente observados en humanos (53–55).

Cabe destacar, que el protocolo de obtención del modelo experimental y las muestras que se usan en esta memoria final de grado fue realizado por Heriberto Castro estudiante de doctorado del Laboratorio de Biología Molecular Nutrición y Biotecnología, en el marco de su proyecto de Tesis Doctoral dirigida por el Prof. Andreu Palou y la Dra. Juana Sánchez.

A continuación se detalla cómo se obtuvieron tanto el modelo experimental como las muestras, considerando que es necesario para la comprensión del trabajo realizado en la presenta memoria final de grado.

El diseño experimental se detalla en la Figura 3. Brevemente, las ratas hembras vírgenes (*Rattus norvegicus*) (Laboratorios Charles River Spain, SA, Barcelona, España), estabuladas a 22 °C con un período de luz/oscuridad de 12h (luz desde 08.00 hasta 20.00 horas) y con un libre acceso a la comida y agua, fueron apareadas con machos. El día del nacimiento, día 0 de lactancia, todas las camadas fueron igualadas a 10 crías por madre. A partir del día 10 de lactancia, las madres con sus respectivas crías fueron distribuidas al azar en dos grupos: grupo control, ratas mantenidas con dieta estándar (3300kcal kg⁻¹, Panlab, Barcelona, España), y grupo cafetería: ratas alimentadas con dieta de cafetería. La dieta cafetería consiste en la ingesta de alimentos como: galletas con paté de hígado y sobrasada, caramelos, tocino, chocolate, cacahuets salados, queso y leche con 20% v/p de azúcar (53, 56). El día 21 de lactancia, las crías se destetaron continuando con su correspondiente dieta control o cafetería hasta día 100 de vida. A partir de día 100 ambos grupos (control y postcafetería) fueron alimentados con dieta estándar. A día 130 días ratas hembras del grupo control y el grupo postcafetería fueron apareadas por machos. El día del nacimiento, día 0 de lactancia, todas las camadas fueron igualadas a 10 crías por madre. Finalmente, tras los 21 días de lactancia, las ratas madre control y postcafetería (n= 7-8) fueron sacrificadas en condición de alimentación. Se extrajo rápidamente el hígado en el que se pesó y se guardó en el congelador a -80°C hasta su análisis.

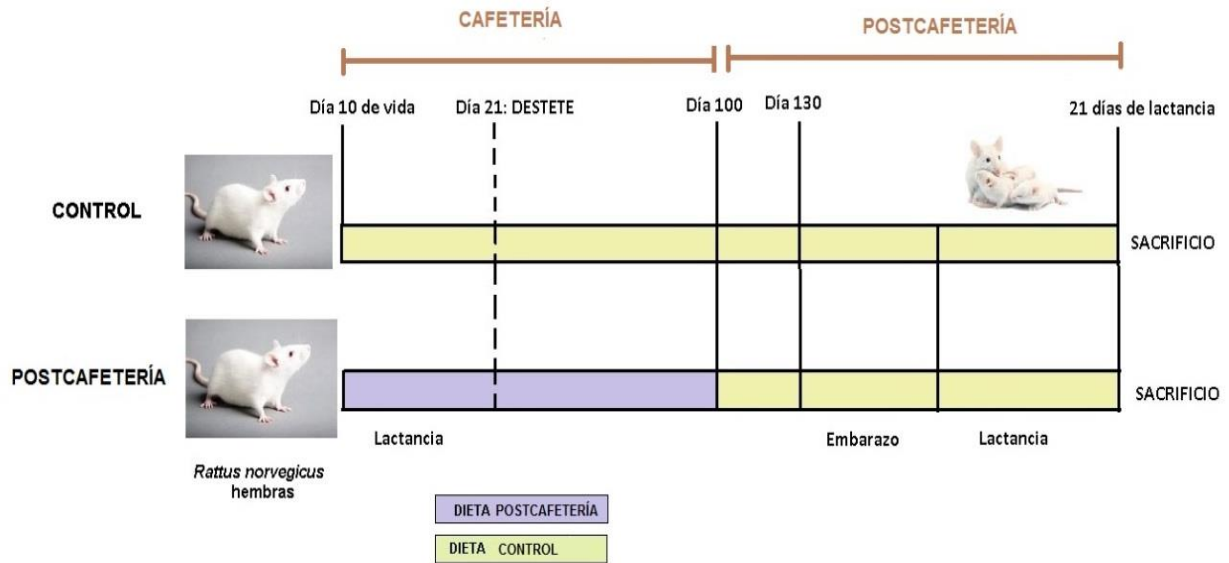


Figura 3: Esquema del protocolo experimental con ratas hembras para la obtención de ratas lactantes del modelo postcafetería.

Aislamiento del ARN:

La extracción del ARN y el análisis de genes de interés fue llevado a cabo por Mónica Enver autora de la presente memoria final de grado.

Para la extracción del ARN total de muestras de hígado de madres control o madres postcafetería se utilizó el kit comercial para extracción de ARN total en columnas (E.Z.N.ATM EaZy Nucleic Acid Isolation, Omega Biotek, Doraville, GA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

En primer lugar, se homogeneizó la muestra de hígado (0,15-0,20 g) con *TRK Lysis Buffer* en tubos Eppendorf de 2mL, en condiciones de frío (en hielo). El *TRK Lysis Buffer*, junto con la acción mecánica de un dispersor de aspas que facilita la rotura del tejido y es el paso clave para empezar la extracción. La muestra homogenizada fue centrifugada a 13000 x g durante cinco minutos y se transfirió el sobrenadante con la pipeta a un Eppendorff de 2 mL. Se añadió 700 µL de Etanol 70% y se mezcló con el vórtex. Todo el volumen de la mezcla fue introducido a una columna *HiBind ARN spin* con un tubo colector de 2 mL y se centrifugó a 10000 x g durante 1 minuto, descartando el eluyente. La columna *HiBind RNA spin* fue colocada en un nuevo tubo colector de 2mL para lavar la columna con 350 µL de *ARN Wash Buffer I* y se centrifugó a 10000 x g durante 1 minuto descartando el eluyente. Seguidamente, se añadió 35 µL de la solución de ADNasa I, directamente sobre la superficie de la membrana de la columna y se incubó a temperatura ambiente (25 – 30°C) durante 15 minutos. Este paso nos permite degradar el ADN y obtener como resultado un ARN más puro, sin contaminación por ADN. Se añadió 400 µL de *Wash Buffer I* y se centrifugó a 10000

x g durante 1 minuto descartando el eluyente. El siguiente paso fue la adición de 500 μ L de *ARN Wash Buffer II* diluido en Etanol 96% invirtiendo varias veces suavemente antes de la centrifugación a 10000 x g durante 1 minuto descartando el eluyente. Se volvió a añadir 350 μ L de *ARN Wash Buffer II* diluido en Etanol 96% seguido de la centrifugación a 1000 x g durante 1 minuto. Se descartó el eluyente y se centrifugaron las columnas con los tubos colectores vacíos a máxima velocidad (20000 x g) durante 2 minutos. Cada columna se colocó en un Eppendorf de 1,5mL y se añadió 40 μ L de agua libre de ARNasas y ADNasas directamente sobre la superficie de la membrana de la columna. Finalmente, se centrifugó a 10000 x g durante 2 minutos obteniendo como eluyente resultante el ARN totalmente purificado.

Cuantificación del ARN y comprobación del estado del ARN purificado

Una vez purificado, el ARN fue cuantificado por el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Además se obtuvieron el valor de los ratios de absorbancia A260/A280 y A260/A230 que nos permiten determinar la pureza del ARN aislado y su posible estado de degradación. Se consideró un ratio superior a 2 para determinar que la preparación es de buena calidad y no se encuentra contaminada por proteínas o ADN (57). En cambio, si presenta un valor diferente es indicativo de la presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes que absorben a una longitud cercana a 280nm (58, 59).

Para comprobar el estado del ARN obtenido, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%. El gel de agarosa fue preparado a partir agarosa en tampón de TBS al 0,5%. Seguidamente, se añadió SYBR safe®, un intercalante de los ácidos nucleicos que emite fluorescencia cuando es excitado a una longitud de onda entre los 280 y 502 nm, en el cual es cancerígeno (60, 61).

Análisis de la expresión génica por RT-qPCR

Se realizó una RT-qPCR para medir los niveles de expresión ARNm de los genes seleccionados en el hígado de ratas madres del grupo control y del grupo postcafetería (Tabla 1).

Genes analizados	
Lipogénesis	Srebf1: Factor de transcripción de unión a elementos de respuesta a esteroides / <i>Sterol regulatory binding transcription factor</i> Fasn: Ácido graso sintasa / <i>Fatty acid synthase</i> Scd-1: Esteroil coenzima A desaturasa / <i>Stearoyl-coenzyme A desaturase1</i>
Oxidación ácidos grasos	Ppara: Peroxisoma proliferador activador del receptor alfa / <i>Peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i> Cpt1a: Carnitina palmitol transferasa 1a / <i>Carnitine palmitoyl transferase 1a</i>
Señalización insulina y leptina	InsR: Receptor de la insulina / <i>Insulin receptor</i> LepR: Receptor de la leptina / <i>Leptin receptor</i>

Tabla 1. Genes cuya expresión génica fue analizada en el hígado de ratas madres del grupo control y del grupo postcafetería.

La RT-qPCR consiste en dos procesos distintos: la retrotranscripción del ARN total a ADN copia (ADNc), y la amplificación de genes seleccionados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*).

El primer paso es la retrotranscripción, es decir, pasar de ARN monocatenario total a ADN copia correspondiente. Para llevar a cabo la retrotranscripción, se mezcló 5 µL del ARN (concentración 50 ng/µL) con 7,5 µL de la mezcla RT (o RT mix). Esta mezcla contenía la enzima retrotranscriptasa viral o enzima transcriptasa inversa; el cofactor MgCl₂ a 4,17 mM; dNTPs (dinucleótidos trifosfato: adenina, timina, citosina, guanina) a 2,5 mM; hexámeros aleatorios definidos como oligonucleótidos de diferente secuencia nucleotídica, y finalmente inhibidores de las ARN (62).

La RT se llevó a cabo en un termociclador (*Thermal Cycler 2720, Applied Biosystem*), con el siguiente programa de temperaturas: 15 min a 20°C; 30 min a 42°C y 5 min a 95°C.

El siguiente paso para completar el proceso de la RT-qPCR consiste en la amplificación del ADNc obtenido anteriormente a través de la PCR. Se trata de una amplificación exponencial, mediante numerosos ciclos, de segmentos de ADN diana y se basa en la unión complementaria de los cebadores o *primers* al ADNc desnaturalizado y en la posterior extensión de los cebadores por parte de la ADN polimerasa (63).

Para realizar la PCR, se mezclaron 2µL de la dilución 1/20 de las muestras de ADNc (producto de la retrotranscripción) con 9µL del *SyBrGreen mix*, previamente preparado. El *SyBrGreen mix* contiene cebadores forward y reverse (a 5µM cada uno) complementarios a una determinada secuencia de cada gen que se quiere amplificar, agua libre de ARNasas y finalmente, el Power SYBER Green PCR Master Mix®. El reactivo *SyBr Green* realiza un papel fundamental en la detección de la amplificación y cuantificación de los genes seleccionados en las muestras. Dicho reactivo contiene el fluoróforo o marcador *SYBR Green I* que se une específicamente a la cadena bicatenaria de ADN. De esta manera, las copias de una secuencia corta de ADN generadas en la amplificación por PCR o amplicones fueron detectadas gracias a la emisión de una señal fluorescente a 520 nm cuando son excitados a 480 nm. La fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de ADN amplificado (40, 64). La PCR se llevó a cabo en un *Applied Biosystems StepOne Plus Real-Time PCR Systems* con el siguiente protocolo de temperaturas: 10 min a 95°C, seguido por un total de 40 ciclos repetidos de 15s a 95°C (desnaturalización del ADN) y 1 min a 60°C (unión de los cebadores y amplificación). Además para verificar la pureza de los productos resultantes, se obtuvieron las curvas de desnaturalización (*Melt Curve*) de acuerdo con las instrucciones del fabricante: 15s a 95°C, 1 min a 60°C y 15s a 95°C (57).

Al finalizar la PCR, los resultados obtenidos de la amplificación se analizaron con el *software (StepOne Software v.2.2.2, Applied Biosystem)*. El método utilizado para la cuantificación del producto de amplificación fue a partir del valor del ciclo umbral (CT del inglés *cycle threshold*). Este valor indica el número de ciclos necesarios para que la señal de fluorescencia detectada sea superior a la señal base fijada por el *software*, pero inferior a la fluorescencia encontrada en la fase de crecimiento exponencial. El valor de CT se visualiza a partir de la curva de amplificación donde mide la fluorescencia emitida en cada ciclo de PCR a tiempo real y está constituida por tres fases distintas: fase de latencia (la acumulación de producto no se puede detectar), fase exponencial y fase de saturación. Por tanto, valores bajos de CT corresponden a una expresión elevada del gen (57).

Para analizar los cambios relativos en la cantidad de ARNm se eligió el ARN ribosómico 18S como gen de referencia o *housekeeping* con una expresión constitutiva. Comprobamos que había poca variación de expresión en nuestros grupos experimentales. El método usado para la cuantificación de la expresión de un determinado gen fue $2^{-\Delta\Delta CT}$ ($2^{CT_{housekeeping}-CT_{gen}}$) (57, 63).

Análisis estadístico:

Todos los resultados obtenidos se representan como media \pm el error estándar de la media (SEM). Para cada gen, se consideró el 100% al valor medio de la expresión génica del grupo control. Así, los niveles de expresión de ARNm de las diferentes muestras fueron comparados con el grupo control. Para observar las diferencias existentes entre los diferentes grupos experimentales (control y postcafetería) se utilizó el test de la *t* de *Student* con el programa estadístico R-Studio. Se considera umbral de significancia, es decir, la existencia de diferencias significativas entre los grupos de estudio, cuando $P < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la expresión de ARNm de los genes involucrados en el metabolismo hepático se encuentran ilustrados en la Figura 4.

La expresión de genes lipogénicos (*Srebf1* y *Fasn*) es mayor en el grupo postcafetería que en el grupo control. De hecho, el gen *Fasn* presenta una mayor expresión significativa que el grupo postcafetería ($P < 0.05$, test de la *t* de *Student*). No obstante, la expresión del *Scd1* es menor en el grupo postcafetería comparado con el grupo control (ver Figura 4(A)).

Se sabe que el gen *Srebf1* codifica para un factor de transcripción esencial, regulador en la expresión de numerosos genes implicados en la lipogénesis hepática, incluyendo el *Fasn* y el *Scd1* (65). El proceso de síntesis de ácidos grasos es realizado principalmente por la enzima graso sintasa, *Fasn*, cuya función es formar ácido palmítico (C16:0) a partir de acetil-CoA y malonil-CoA (66). En cambio, el *Scd-1* es el responsable de la desaturación de los ácidos grasos de cadena larga obteniendo como productos, el ácido palmitoleico (16:1) y el ácido oleico (18:1) (67). Por lo tanto, es de esperar que ambos genes lipogénicos (*Fasn* y *Scd1*) al estar regulados por el mismo factor de transcripción, *SREBP1c*, presenten niveles de expresión similar (68). Sin embargo, observando nuestros resultados (Figura 4 (A)), la *Srebf1* activa la expresión significativa del *Fasn* en el grupo postcafetería, pero no la expresión en el *Scd1*.

De acuerdo con los resultados de diversos estudios (56, 69, 70), la exposición a un exceso de grasa proveniente de la dieta induce una menor expresión de los genes lipogénicos en el hígado (*Srebf1*, *Fasn* y *Scd1*). Se dice que esta baja expresión podría estar

relacionada con el aumento en la expresión de los niveles de ARNm del receptor de insulina, codificada por el gen *InsR*, sugiriendo una mayor señalización de la insulina y al mismo tiempo, estar relacionado por un aumento en los niveles de ARNm del factor de transcripción *Srebf1* (71). Se ha descrito que la expresión del gen *Fasn* está regulada por la concentración de ácidos grasos, existiendo una correlación entre la cantidad de ácidos grasos y actividad de la enzima FASN: por lo que a mayor cantidad de ácidos grasos, menor es la actividad de la FASN (65, 68).

Por lo tanto, en nuestro modelo, pese a que ambos grupos están bajo una misma dieta normolipídica, las ratas de postcafetería presentan una activación, al menos a nivel de expresión génica, en genes lipogénicos, sugiriendo un aumento en la síntesis *de novo* de ácidos grasos. Se ha descrito que un aumento en la síntesis *de novo* de ácidos grasos, junto con una disminución en la β -oxidación y un aumento en la liberación de ácidos grasos del tejido adiposo puede conducir al desarrollo de esteatosis hepática (67). De modo que las ratas del modelo postcafetería, que presentan obesidad, manifiestan al final de la lactancia alteraciones en la expresión génica que podrían conducir a una mayor acumulación de lípidos hepáticos. No obstante, cabría confirmar esta posibilidad analizando los niveles hepáticos de lípidos en estas ratas.

Respecto a la expresión de genes relacionados con la oxidación de los ácidos grasos, *Ppara* y *Cpt1a* son menores en el grupo postcafetería que el grupo control (ver Figura 4(B)). El *Ppara* codifica para un factor de transcripción regulador en la expresión génica, el PPAR α , de los principales enzimas de la oxidación de los ácidos grasos, entre ellos se incluye la CPT1a (72). En concreto, la CPT1a regula el paso de los ácidos grasos citosólicos al interior de la membrana mitocondrial para llevar a cabo la β -oxidación (73). Nuestros resultados muestran que, comparado con ratas del grupo control, las ratas del grupo postcafetería presentan una ligera menor expresión del ARNm del *Ppara* y, consecuentemente del ARNm de la *Cpt1a*, transcripcionalmente regulada por el PPAR α (74). A pesar de que los resultados no alcanzan una significancia estadística, esta menor expresión de *Cpt1a* sugeriría una menor β -oxidación de los ácidos grasos (75).

En el hígado, la concentración del malonil-CoA, una molécula intermediaria de la lipogénesis *de novo*, es un importante punto de control del metabolismo de los ácidos grasos. Se ha comprobado que elevadas concentraciones de malonil-CoA inhiben la actividad de la CPT1a y por tanto, de la entrada de los ácidos grasos en la mitocondria, con lo cual no se estimula la β -oxidación (76). En situación de ingesta, la oxidación de los ácidos grasos se encuentra inhibida y se promueve la lipogénesis permitiendo el almacenamiento y distribución de los ácidos grasos (77). De esta manera, cuando el balance energético resulta negativo disminuye el malonil-CoA y permite el aumento de la oxidación de los ácidos grasos. Este control de la CPT1a por el malonil-CoA podría ser un mecanismo preventivo a la oxidación y síntesis de ácidos grasos de manera simultánea en el hígado (75).

Diversos estudios han visto que la ingesta de una dieta lipídica estimula la oxidación de los ácidos grasos para compensar el exceso de lípidos en el hígado, debido principalmente al incremento en la expresión del receptor PPAR α , y como consecuencia prevenir una acumulación excesiva hepática (72, 78). Como ya se ha comentado anteriormente, una menor oxidación hepática de los ácidos grasos pueden conducir al desarrollo de esteatosis hepática (67).

Además, se ha descrito que una deficiencia del PPAR α estimula hipoglucemia, debido a la conexión existente entre este receptor y la homeostasis de la glucosa (79). Incluso, en un estudio realizado con ratas deficientes de PPAR α (PPAR α -/-) presentan una mala regulación de la oxidación de los ácidos grasos en el hígado y nula capacidad de oxidación, provocando el desarrollo de una esteatosis hepática (80). No obstante, estudios bajo una dieta rica en grasas durante el embarazo demuestran que se estimula la lipólisis y la β -oxidación ya que la madre aporta una cantidad significativa de glucosa para el feto y así, mantener sus niveles de glucosa estables (35).

En cuanto a la expresión de genes relacionados con la señalización de la insulina y de la leptina, en concreto el receptor de insulina (InsR) y leptina (LepR), el grupo postcafetería muestra una menor expresión significativa en el ARNm del LepR ($P < 0,05$, test de la t de Student), y una tendencia a una mayor expresión (no significativa) de InsR comparado con el grupo control (ver Figura 4 (C)).

La leptina es una hormona clave en la regulación del balance energético (81). Esta hormona es sintetizada y secretada principalmente por el tejido adiposo, y se libera en el sistema circulatorio en función de la cantidad de grasa almacenada en el cuerpo (82, 83). La leptina actúa interactuando con su receptor a nivel hipotalámico como señalizadora del estatus nutricional, por lo cual se la considera como una importante señal reguladora del peso corporal y del balance energético (84). Por lo que si hay una gran cantidad de grasa corporal, los niveles circulantes de leptina son mayores e incrementa la activación de los receptores de la leptina (85). Una vez que la leptina interacciona con sus respectivos receptores (LepR) envía una señal al cerebro que provoca una disminución de la ingesta (saciedad) y un aumento del gasto energético (81, 86). Sin embargo, la leptina puede ejercer otros efectos periféricos, ya que se ha descrito la presencia de su receptor en otros tejidos (87).

Diversos estudios demuestran que una dieta hiperlipídica materna durante el embarazo induce un incremento de los niveles de leptina circulantes, alcanzando a una situación de hiperleptinemia, como consecuencia del aumento del contenido graso corporal (88). Por lo tanto, de acuerdo con nuestros resultados respecto a la expresión de LepR y, sabiendo que las ratas postcafetería tienen niveles circulantes de leptina elevados (datos no presentados en esta memoria), se podría interpretar que el grupo postcafetería presenta

una respuesta insuficiente del hígado ante la leptina, conduciendo a una resistencia a la leptina. La disminución de los niveles de LepR en las ratas del grupo postcafetería, y por tanto, la menor señalización de la leptina, podría explicar la menor expresión de PPara y Cpt1a observada en estos roedores, aunque los efectos no son significativos. Existen evidencias del efecto periférico de la leptina en el metabolismo, es decir, se ha observado que en el tejido adiposo, la leptina parece ser esencial en la regulación del metabolismo del adipocito, aumentando la β -oxidación y disminuyendo la lipogénesis. Así, bajo una dieta rica en grasa se observa, en algunos depósitos de tejido adiposo, una disminución en los niveles de expresión del LepR, junto con un descenso en los niveles de expresión del Ppara y CPT1 (89). Al mismo tiempo, la insulina es también una hormona importante en la regulación del balance energético, ya que juega un papel fundamental en la regulación a nivel transcripcional de la expresión de enzimas relacionados con el metabolismo de lípidos en el hígado. La síntesis y liberación de la insulina por la células β pancreáticas en respuesta a niveles elevados de glucosa en sangre, aumenta la captación de glucosa por las células a través la activación de sus receptores (InsR) estimulando la síntesis de ácidos grasos o lipogénesis. Por lo tanto, en relación con los genes relacionados con el metabolismo hepático, se sabe que la insulina regula directamente en la expresión del Srebf1 (71, 90). Así, el pequeño aumento observado en la expresión de Srebf1 en el grupo postcafetería, respecto al grupo control puede ser debido a una ligera mayor señalización de la insulina (en la Figura 4 (C) se observa un leve incremento en los niveles del receptor de insulina), ya que el SREBP1 es un factor dependiente de la insulina (91).

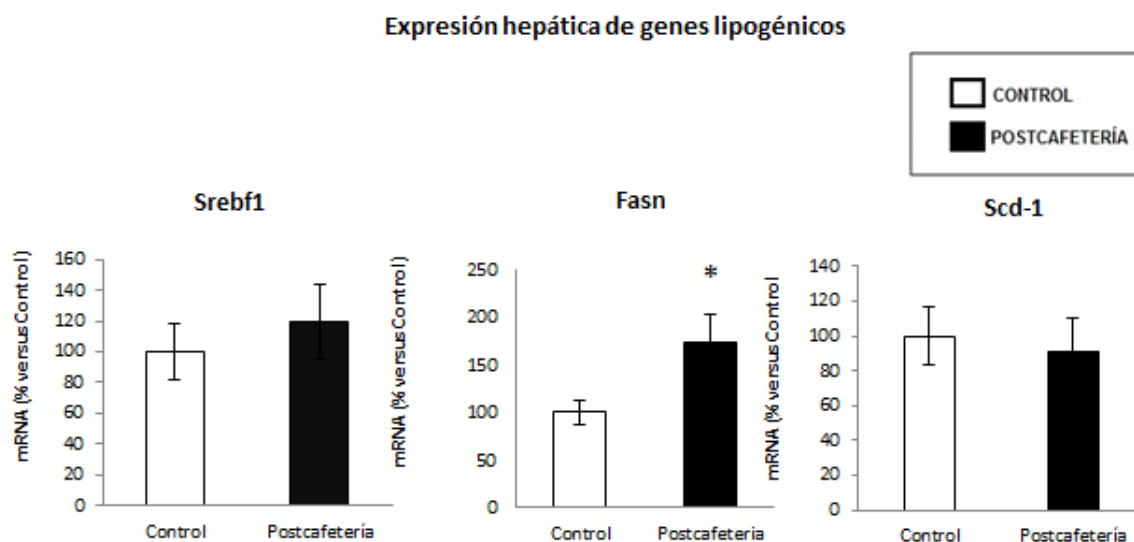
Numerosos estudios con ratas lactantes alimentadas con dieta rica en grasas demuestran que producen un rápido deterioro en la sensibilidad de la insulina a nivel corporal, incluido el hígado, y conducen a un estado de resistencia a la insulina, aumentando las posibilidades de padecer diabetes y obesidad (27, 71). Se ha visto que un consumo de dietas con una mayor proporción de ácidos grasos saturados se asocia con hiperglicemia, hiperinsulinemia, además de la resistencia a la insulina (92). Incluso, estudios a nivel molecular han determinado que el incremento en la concentración de ácidos grasos libres circulantes puede llevar a cambios en la expresión del InsR y alterar la unión de la insulina con su receptor (93). De hecho, existe el riesgo de padecer diabetes gestacional durante el embarazo, debido a que las hormonas placentarias, especialmente el lactógeno placentario (Hsc) y la prolactina, bloquean la acción de la insulina en el cuerpo de la madre, desencadenando la resistencia a la insulina (37, 90, 94).

Por tanto, el conjunto de estos resultados (ver Figura 4) revela que la obesidad dietética establecida con anterioridad a la gestación y a la lactancia produce adaptaciones en el metabolismo hepático en ratas al final del periodo de lactancia.

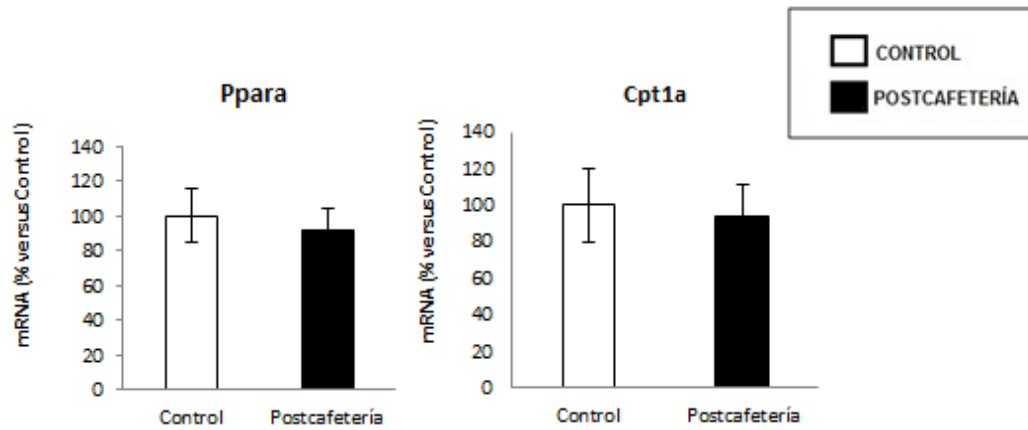
Las madres del modelo postcafetería presentan una ligera mayor expresión de InsR, que conlleva a una mejor sensibilización de la insulina en el hígado, estimulando la expresión

de genes relacionados con la síntesis de ácidos grasos (Srebf1 y Fasn) y, al mismo tiempo, inhibiendo la expresión de genes relacionados con la oxidación de los ácidos grasos (Ppara y Cpt1a). Tal como se mencionó anteriormente, la insulina es la hormona principal reguladora de los enzimas lipogénicos. En nuestro caso, no hay evidencias significativas para afirmar que el grupo postcafetería presente una resistencia a la insulina a causa de alteraciones en el receptor de la insulina, por lo que sería interesante determinar los niveles de insulina circulantes. En ocasiones, en el embarazo de mujeres con antecedentes de diabetes y en mujeres obesas se producen alteraciones en la tolerancia a la glucosa produciendo una diabetes gestacional (50, 95).

Asimismo, se ha observado un incremento significativo de la expresión de Fasn, principal enzima implicado en la síntesis *de novo* de ácidos grasos. Cabe recordar que tanto el aumento de síntesis *de novo*, como una menor oxidación de ácidos grasos se han relacionado con la progresión de la esteatosis hepática (67). También, es importante destacar que cuando la β -oxidación se ve reducida de manera prolongada, debido principalmente a la menor sensibilidad de la insulina, provoca una mayor deposición de los triglicéridos dando lugar a la a esteatosis hepática y la lipotoxicidad (12). Sin embargo, en nuestro caso, no se ha observado una disminución significativa en la expresión de genes implicados en la oxidación de ácidos grasos, aunque los niveles de expresión del Ppara y la Cpt1a son menores en ratas del grupo postcafetería. Esta ligera disminución, posiblemente se debe a la disminución de la expresión del receptor de la leptina (LepR).



Expresión hepática de genes relacionados con la oxidación de los ácidos grasos



Expresión hepática de genes relacionados con la señalización de la insulina y de la leptina

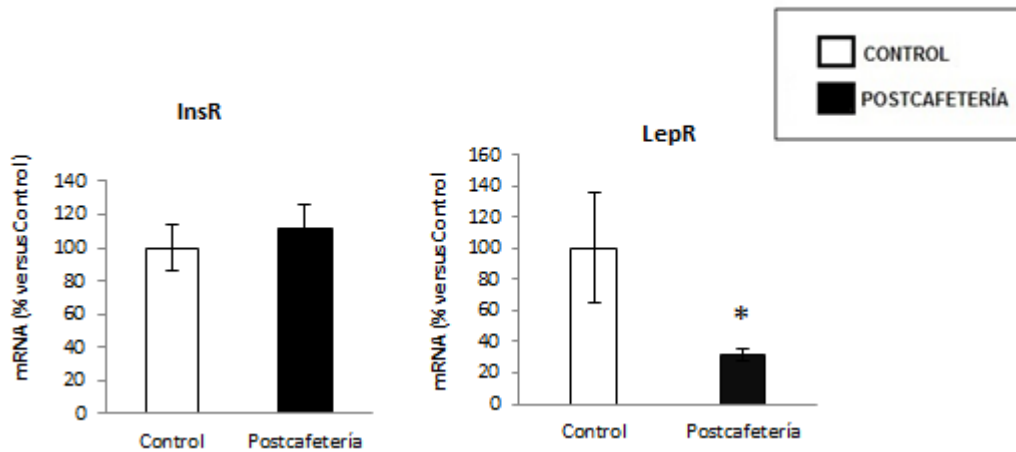


Figura 4. Expresión de los niveles de ARNm de los genes relacionados con la metabolismo lipídico en el hígado en ratas hembras control o del modelo postcafetería al final del periodo de lactancia. Para la obtención del modelo postcafetería las ratas hembras fueron alimentadas con dieta de cafetería desde el día 10 de vida hasta el día 100, cuando se alimentaron con una dieta control hasta día 130. A día 130 las ratas del modelo postcafetería y control se aparearon con machos. El hígado se obtuvo al final del periodo de lactancia. Los valores mostrados pertenecen a la media de los resultados de cada grupo (n de a 10 a 12 muestras por grupo) y su barra con el error estándar de la media (\pm SEM). A) Genes relacionados con la lipogénesis (Srebf1, Fasn y Scd1). B) Genes relacionados con la oxidación de ácidos grasos (Ppara y Cpt1a). C) Genes relacionados con la señalización de insulina y leptina (InsR y LepR). Estadística: * diferencias significativas entre el grupo control y el grupo postcafetería ($P < 0.05$, test de la *t* de Student). Srebf1: *Sterol regulatory factor transcription*, Fasn: *fatty acid synthase*, Scd1: *stearoyl-Coenzyme A desaturase 1*, PPara: *peroxisome proliferator activated receptor alfa*, Cpt1a: *carnitine palmitoyl transferase 1a*, InsR: *insulin receptor* y LepR: *leptin receptor*.

CONCLUSIÓN

La obesidad dietética establecida antes del embarazo produce cambios en la expresión hepática de genes implicados en el metabolismo de los lípidos. En particular, aumenta de forma significativa la expresión de la ácido graso sintasa (Fasn) y disminuye la del receptor de la leptina (LepR). Además, el aumento de la síntesis de ácidos grasos, juntamente con una leve disminución de la oxidación de los ácidos grasos podría ser indicativo de cambios metabólicos que podrían conducir a una esteatosis hepática

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi más sincera gratitud a mi tutora de fin de grado, Dra. Juana Sánchez Roig, por concederme un trabajo tan interesante que me ha permitido aprender y ganar experiencia dentro del mundo de la investigación a pequeña escala, por su predisposición y ayuda durante todo el año académico. También, me gustaría agradecer al doctorando Heriberto Castro, por su gran ayuda en cualquier momento y paciencia, y por los conocimientos transmitidos para finalmente realizar el trabajo presente. Agradecer también a la Dra. Paula Oliver por abrirme camino dentro del grupo de investigación de Biología Molecular, Nutrición y Biotecnología presentándome a mi tutora del trabajo de fin de grado y por sus consejos de positivismo. Finalmente, agradecer a la Dra. Cristina Nicolau por su atención y comprensión.

BIBLIOGRAFÍA

1. WHO: World Health. WHO. World Health Organization. 2015.
2. SEEDO. (2015). SEEDO. [WWW document]. URL <http://www.seedo.es>
3. Hebestreit A, Börnhorst C, Barba G, *et al.* Associations between energy intake, daily food intake and energy density of foods and BMI z-score in 2-9-year-old European children. *Eur J Nutr* 2014;53:673–681.
4. McConahy KL, Smiciklas-Wright H, Mitchell DC, Picciano MF. Portion size of common foods predicts energy intake among preschool-aged children. *J Am Diet Assoc* 2004;104:975–979.

5. Ahrens W, Bammann K, de Henauw S, Halford J, Palou A PI et al. Disorders—IDEFICS; Understanding and preventing childhood obesity and related disorders. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006;16:302–308.
6. Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, Lamb MM FK. Prevalence of high body mass index in US children and adolescents, 2007-2008. *JAMA* 2010;303:242–249.
7. World Health Organization. Controlling the global obesity epidemic. [WWW document]. URL <http://www.who.int/nutrition/topics/obesity/en/>
8. Poston L, Patel N. Dietary recommendations for obese pregnant women: current questions and controversies. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2014;93:1081–1084.
9. Lean M, Gruer L, Alberti G, Sattar N. Obesity — can we turn the tide ? Whose responsibility ? The real goal : prevention Changing the obesogenic environment. *Obesity* 2010:1261–1264.
10. Levin BE. Metabolic imprinting: critical impact of the perinatal environment on the regulation of energy homeostasis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006;361:1107–1121.
11. Remacle C, Bieswal F, Reusens B. Programming of obesity and cardiovascular disease. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004;28 Suppl 3:S46–S53.
12. Hashimoto T, Cook WS, Qi C, Yeldandi A V., Reddy JK, Rao MS. Defect in peroxisome proliferator-activated receptor α -inducible fatty acid oxidation determines the severity of hepatic steatosis in response to fasting. *J Biol Chem* 2000;275:28918–28928.
13. McMillen, I. C., Macloughlin, S. M., Muhlhausler, B. S., Gentili, S., Duffield, J. L., and Morrison JL. Developmental origins of adult health and disease: the role of periconceptual and foetal nutrition. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008;102:82–89.
14. Nathanielsz P, Poston L TPI. In utero exposure to maternal obesity and diabetes: animal models that identify and characterize implications for future health. *Clin Perinatol* 2007;34:515–26.
15. Barker DJ. The fetal and infant origins of adult disease. *BMJ Br Med J* 1990;301:1111.
16. Wilson J. The Barker hypothesis. An analysis. *Aust New Zeal J Obstet Gynaecol* 1999;39:1–7.
17. González E. Origen fetal de enfermedades expresadas en la edad adulta Fetal origins of adult diseases. :303–314.
18. Barker DJP. The Developmental Origins of Adult Disease. *J Am Coll Nutr* 2004;23:588–595.

19. Picó C, Palou M, Priego T, Sánchez J, Palou A. Metabolic programming of obesity by energy restriction during the perinatal period: Different outcomes depending on gender and period, type and severity of restriction. *Front Physiol* 2012;3 NOV:1–14.
20. Lucas a, Baker B a, Desai M, Hales CN. Nutrition in pregnant or lactating rats programs lipid metabolism in the offspring. *Br J Nutr* 1996;76:605–612.
21. Chastain DR, Snider JL, Collins GD, Perry CD, Whitaker J, Byrd S a. Water deficit in field-grown *Gossypium hirsutum* primarily limits net photosynthesis by decreasing stomatal conductance, increasing photorespiration, and increasing the ratio of dark respiration to gross photosynthesis. *J Plant Physiol* 2014;171:1576–1585.
22. Bouret SG, Simerly RB. Development of leptin-sensitive circuits. *J Neuroendocrinol* 2007;19:575–582.
23. Begum G, Stevens a., Smith EB, *et al.* Epigenetic changes in fetal hypothalamic energy regulating pathways are associated with maternal undernutrition and twinning. *FASEB J* 2012;26:1694–1703.
24. Palou, M., Priego, T., Sanchez, J., Torrens, J. M., Palou, A., and Pico C. Moderate caloric restriction in lactating rats protects offspring against obesity and insulin resistance in later life. *Endocrinology* 2010;151:1030–1041.
25. Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ SE *et al.* Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:17046–17049.
26. Van Abeelen AF, Elias SG, Bossuyt PM, Grobbee DE, van der Schouw YT *et al.* Famine exposure in the young and the risk of type 2 diabetes in adulthood. *Diabetes* 2012;61:2255–2260.
27. Morrison CD, Huypens P, Stewart LK, Gettys TW. Implications of crosstalk between leptin and insulin signaling during the development of diet-induced obesity. *Biochim Biophys Acta* 2009;1792:409–416.
28. Barker D, Eriksson J, Forsen T, Osmond C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int J Epidemiol* 2002;31:1235–1239.
29. Langley-Evans SC. Developmental programming of health and disease. *Proc Nutr Soc* 2006;65:97–105.
30. Martorell R, Stein AD, Schroeder DG. Symposium : Obesity in Developing Countries : Early Nutrition and Later Adiposity 1. *Am Soc Nutr Sci* 2001;131:874–880.
31. Catalano PM, Ehrenberg HM. The short- and long-term implications of maternal obesity on the mother and her offspring. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol* 2006;113:1126–1133.

32. Chu SY, Callaghan WM, Kim SY et al. Maternal obesity and risk of gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2007;30:2070–6.
33. Guo F, Jen KL. High-fat feeding during pregnancy and lactation affects offspring metabolism in rats. *Physiol Behav* 1995;57:681–686.
34. Sivan E, Chen X, Homko CJ, Reece EA BG. Longitudinal study of carbohydrate metabolism in healthy obese pregnant women. *Diabetes Care* 1997;20:1470–75.
35. Herrera, E. G-C& M. L. Lipid Metabolism in Pregnancy. *Biol Neonate* 1987;51:70–77.
36. Rodney A. Rhoades GAT. *Fisiología médica*. Barcelona: Masson-Little, Brown; 1996.
37. Tresguerres JAF. Fisiología de la fecundación, embarazo y parto. In: *Fisiología humana*. 3a ed. Madrid: Interamericana/McGraw-Hil, 2005, p 1178.
38. Mellenberger RW, Bauman DE, Nelson DR. Metabolic Adaptations During Lactogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1974;138:373–379.
39. Williamson C.S. Nutrition in pregnancy. *J Iowa State Med Soc* 1947;31:28–59.
40. Zhang J, Wang C, Terroni PL, Cagampang FR a, Hanson M, Byrne CD. High-unsaturated-fat, high-protein, and low-carbohydrate diet during pregnancy and lactation modulates hepatic lipid metabolism in female adult offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:R112–R118.
41. Rebuffe-Scrive M, Enk L. Fat Cell Metabolism in Different Regions in Women. 1985;75:1973–1976.
42. Campbell-Brown M,. Hytten F .E. Chamberlain G. BFE. Nutrition. In: *Clinical physiology in obstetrics*. *Blackwell Sci* 1998:168–170.
43. Irving RJ, Walker BR, Noon JP et al. Microvascular correlates of blood pressure, plasma glucose, and insulin resistance in health. *Cardiovasc Res* 2002;53:271–276.
44. Stevens-Simon C, Thureen P, Barrett J et al. Regional body fat distribution and insulin resistance during adolescent pregnancy. *J Am Diet Assoc* 2002;102:563–565.
45. Brelje TC, Scharp DW, Lacy PE, Ogren L T, F, Robertson M, Friesen HG SR. Effect of homologous placental lactogens, prolactins, and growth hormones on islet B-cell division and insulin secretion in rat, mouse, and human islets: implication for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy. *Endocrinology* 1993;132:879–87.
46. Ryan EA EL. Role of gestational hormones in the induction of insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;67:341–7.

47. Kitzmiller J. The endocrine pancreas and maternal metabolism. *Matern Endocrinol* 1980;58–83.
48. Lynch CM, Sexton DJ, Hession M MJ. Obesity and mode of delivery in primigravid and multigravid women. *Am J Perinatol* 2008;25:163–7.
49. Chen A, Feresu S, Fernandez C RWM. Maternal Obesity and the Risk of Infant Death in the United States. *Epidemiology* 2009;20:74–81.
50. Sheiner E, Levy A, Menes TS, Silverberg D KM, M. M. Maternal obesity as an independent risk factor for caesarean delivery. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2004;18:196–201.
51. Sebire N, Jolly M, Harris J, Wadworth J, Joffe M B, R, Regan L RS. Maternal obesity and pregnancy outcome: a study of 287,213 pregnancies in London. *Int J Obes* 2001;25:1175–82.
52. Athukorala C, Rumbold AR, Willson KJ, Crowther C a. The risk of adverse pregnancy outcomes in women who are overweight or obese. *BMC Pregnancy Childbirth* 2010;10:56.
53. Castro H, Pomar C a, 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. *Int J Obes (Lond)* 2014;3513:1–8.
54. Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: Biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology* 2010;51:679–689.
55. Palou M, Priego T, Sánchez J, *et al.* Sequential changes in the expression of genes involved in lipid metabolism in adipose tissue and liver in response to fasting. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 2008;456:825–836.
56. Reynés B, García-Ruiz E, Díaz-Rúa R, Palou A, Oliver P. Reversion to a control balanced diet is able to restore body weight and to recover altered metabolic parameters in adult rats long-term fed on a cafeteria diet. *Food Res Int* 2014;64:839–848.
57. Applied Biosystems. Essentials of Real Time PCR About Sequence Detection Chemistries TaqMan Chemistry. *ReVision* 2005:1–8.
58. Krajisnik T, Björklund P, Marsell R LÖ *et al.* Fibroblast growth factor-23 regulates parathyroid hormone and 1 α -hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells. *Endocrinol J* 2007;195:125–131.
59. Davidson. (2014). Nanodrop. [WWW document]. URL http://www.bio.davidson.edu/projects/gcat/protocols/NanoDrop_tip.pdf
60. Biomedical Genomics. (2014). RNA Quality Control. [WWW document]. URL http://biomedicalgenomics.org/RNA_quality_control.html

61. Bassler, H.A., S.J. Flood, K.J. Livak, J. Marmaro RK, Batt. and CA. Use of a fluorogenic probe in a PCR-based assay for the detection of *Listeria monocytogenes*. *App Environ Microbiol* 1995;61:3724–3728.
62. Stangegaard M, Dufva IH, Dufva M. Reverse transcription using random pentadecamer primers increases yield and quality of resulting cDNA. *Biotechniques* 2006;40:649–657.
63. Heid Stevens, J., Livak, K.J., and Williams, P.M. C a. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996;6:986–994.
64. Sigma-Aldrich. SYBR Green based qPCR. [WWW document]. URL <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/molecular-biology/pcr/quantitative-pcr/sybr-green-based-qpcr.html>
65. Foretz M, Pacot C, Dugail I, *et al.* ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose. *Mol Cell Biol* 1999;19:3760–3768.
66. Dorn C, Riener MO, Kirovski G *et al.* Expression of fatty acid synthase in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Clin Exp Pathol* 2010;3:505–514.
67. Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest* 2008;118.
68. Caimari A, Oliver P, Rodenburg W, Keijer J, Palou A. 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* 2010;21:1127–1133.
69. Llopis M, Sa J, Priego T, Palou A, Pico C. Maternal fat supplementation during late pregnancy and lactation influences the development of hepatic steatosis in offspring depending on the fat source. *J Agric Food Chem* 2014;62:1590–601.
70. Priego T, Sánchez J, Picó C, Palou A. Sex-differential expression of metabolism-related genes in response to a high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)* 2008;16:819–826.
71. Kahn BB, Flier JS. On diabetes : insulin resistance Obesity and insulin resistance. 2000;106:473–481.
72. Patsouris D, Reddy JK, Müller M, Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the effects of high-fat diet on hepatic gene expression. *Endocrinology* 2006;147:1508–1516.
73. Huang YY, Gusdon AM QSL. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular pathways and therapeutic strategies. *ipids Heal Dis* 2013;12:171.
74. Steineger HH, Sorensen HN, Tugwood JD, Skrede S, Spydevold O, Gautvik KM. Dexamethasone and insulin demonstrate marked and opposite regulation of the

- steady-state mRNA level of the peroxisomal proliferator-activated receptor (PPAR) in hepatic cells. Hormonal modulation of fatty-acid-induced transcription. *Eur J Biochem* 1994;225:967–974.
75. Orellana-Gavalda JM, Herrero L, Malandrino MI et al. Molecular therapy for obesity and diabetes based on a long-term increase in hepatic fatty-acid oxidation. *Hepatology* 2011;53:821–832.
 76. Gao S, Keung W, Serra D, et al. Malonyl-CoA mediates leptin hypothalamic control of feeding independent of inhibition of CPT-1a. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011;301:R209–R217.
 77. Berlanga A, Guiu-jurado E, Porrás JA, Auguet T. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Gastroenterol* 2014;7:221–239.
 78. Nguyen P, Leray V, Diez M, et al. Liver lipid metabolism. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2008;92:272–283.
 79. Patsouris D, Mandard S, Voshol PJ, Escher P, Tan NS, Havekes LM, Koenig W, Marz W, Tafuri S, Wahli W, Muller M KS. PPAR α governs glycerol metabolism. *J Clin Invest* 2004;114:94–103.
 80. Chakravarthy M V., Pan Z, Zhu Y, et al. “New” hepatic fat activates PPAR α to maintain glucose, lipid, and cholesterol homeostasis. *Cell Metab* 2005;1:309–322.
 81. Rouru J, Cusin I, Zakrzewska KE, Jeanrenaud B R-JF. Effects of intravenously infused leptin on insulin sensitivity and on the expression of uncoupling proteins in brown adipose tissue. *Endocrinology* 1999;140:3688–3692.
 82. Cohen P, Friedman JM. Leptin and the control of metabolism: role for stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1). *J Nutr* 2004;134:2455S–2463S.
 83. Ahima, R. S., Prabakaran, D., Mantzoros, C., Qu, D., Lowell, B. M-, tos-Flier, E. & Flier JS. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 1996;382:250–252.
 84. Tartaglia L a, Dembski M, Weng X, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 1995;83:1263–1271.
 85. Himms-Hagen J. Physiological roles of the leptin endocrine system: differences between mice and humans. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1999;36:575–655.
 86. Ahima RS FJ. Leptin. *Annu Rev Physiol* 2000;62:413–37.
 87. Margetic S, Gazzola C, Pegg GG HR. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;26:1407–1433.

88. Mantzoros CS. The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. *Ann Intern Med* 1999;130:671–680.
89. Pico C, Oliver P, Sánchez J, Miralles O, Caimari A PT et al. The intake of physiological doses of leptin during lactation in rats prevents obesity in later life. *Int J Obes* 2007;32:1199–1209.
90. Zhang J, Zhang F, Didelot X, et al. Maternal high fat diet during pregnancy and lactation alters hepatic expression of insulin like growth factor-2 and key microRNAs in the adult offspring. *BMC Genomics* 2009;10:478.
91. Foretz, M., Guichard, C., Ferré, P., and Foufelle F. Sterol regulatory binding element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:12737–12742.
92. J. Wang, S. Obici, K. Morgan, N. Barzilai, Z. Feng LR. Overfeeding rapidly induces leptin and insulin resistance. *Diabetes* 2001;50:2786–2791.
93. Tigas S, Sunehag A, Haymond MW. Metabolic adaptation to feeding and fasting during lactation in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:302–307.
94. Vernon RG. Endocrine control of metabolic adaptation during lactation. *Proc Nutr Soc* 1989;48:23–32.
95. Zhang C, Ning Y. Effect of dietary and lifestyle factors on the risk of gestational diabetes : *Am J Clin Nutr* 2011;94:1975–1979.