



**Universitat de les  
Illes Balears**

Facultat de Ciències

**Memòria del Treball de Fi de Grau**

**Programación metabólica de la obesidad por restricción calórica durante la gestación: estudio de los efectos sobre el desarrollo de tejidos implicados en la homeostasis energética.**

Rocío Foguer Morales

**Grau de Bioquímica**

Any acadèmic 2015-16

DNI de l'alumne: 43195711D

Treball tutelat per Catalina Picó Segura  
Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut.

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Paraules clau del treball:

Programación metabólica, obesidad, restricción calórica, gestación.



# Índice

---

<b>Resumen</b> .....	4
<b>1. Introducción</b> .....	4
<b>2. Objetivos</b> .....	5
<b>3. Revisión bibliográfica sobre la programación metabólica de la obesidad por alteraciones nutricionales durante la gestación</b> .....	6
3.1. Búsqueda bibliográfica.....	6
3.2. Obesidad.....	7
3.2.1. Prevalencia de la obesidad.....	8
3.3. Homeostasis energética: mecanismo de regulación del peso corporal.....	8
3.4. Efectos de una malnutrición durante la gestación sobre el desarrollo fetal.....	12
3.5. Mecanismos de programación metabólica de la obesidad por restricción calórica durante la gestación.....	13
3.5.1. Programación del hipotálamo y sistema nervioso simpático.....	14
3.5.2. Alteración del patrón de leptina.....	15
3.5.3. Mecanismos epigenéticos.....	16
3.6. El crecimiento compensatorio como sistema agravante de la programación metabólica de la obesidad.....	17
3.7. Estrategias para revertir los efectos de la programación.....	20
<b>4. Estudio experimental</b> .....	22
4.1. Diseño experimental.....	22
4.2. Materiales y métodos.....	24
4.2.1. Extracción de ARN.....	24
4.2.2. Retrotranscripción de ARN a ADNc.....	24
4.2.3. PCR cuantitativa a tiempo real.....	24
4.2.4. Análisis morfométrico.....	25
4.2.5. Análisis estadístico.....	25
4.3. Resultados.....	25
4.3.1. Pesos tejido adiposo retroperitoneal.....	25
4.3.2. Análisis morfométrico.....	26
4.3.3. Expresión génica de GDI, ObRb, ATGL y PPAR $\gamma$ .....	27
4.4. Discusión.....	27
<b>5. Conclusiones</b> .....	29
<b>6. Referencias bibliográficas</b> .....	31

# Resumen

---

El desarrollo temprano constituye una etapa vital caracterizada por una elevada sensibilidad a los factores ambientales. Así, se pueden encontrar diversos estudios epidemiológicos en humanos y modelos experimentales en animales que han aportado fuertes evidencias de que una alteración nutricional a lo largo de esta etapa, conduce al nacimiento de una descendencia con una mayor susceptibilidad a padecer enfermedades crónicas en su vida adulta. Entre éstas, debido a su elevada prevalencia, es de especial interés destacar la obesidad. En el presente trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica sobre las principales causas y factores que parecen conducir a esta mayor prevalencia de la obesidad en la descendencia de madres sometidas a una restricción calórica durante la gestación. Concretamente, se ha destacado la importancia del sistema nervioso y de la hormona leptina en la homeostasis energética y se han descrito diversas alteraciones en estos sistemas que podrían ser causa del mayor riesgo de padecer obesidad en la adultez. También se destaca la importancia de la epigenética y las modificaciones encontradas en estudios realizados bajo dichas condiciones, que podrían contribuir a esta mayor susceptibilidad de padecer obesidad. La revisión bibliográfica también se ha centrado en la búsqueda de posibles estrategias para revertir los efectos de la restricción calórica durante la gestación, destacando por su evidencia probada en modelos animales, la suplementación postnatal con leptina.

Finalmente, se ha realizado un pequeño estudio experimental basado en un modelo animal con ratas gestantes sometidas a una restricción calórica moderada durante los 12 primeros días de gestación. Tras un estudio de expresión génica y un estudio morfológico, a partir de muestras procedentes de la descendencia a una edad de 6 meses considerada adulta, los resultados han mostrado una serie de alteraciones en el metabolismo y morfología del tejido adiposo que sugieren que el efecto de la restricción calórica durante la gestación conduce a una mayor adiposidad en este tejido y por tanto, a un mayor riesgo de padecer obesidad en la descendencia adulta respecto a animales controles.

## 1. Introducción

---

El desarrollo fetal constituye un proceso de vital importancia que transcurre en el útero materno, a lo largo del cual se llevan a cabo toda una serie de acontecimientos que permiten finalmente el nacimiento de un ser completamente formado. Durante la vida fetal se producen una serie de etapas críticas que corresponden con el desarrollo de determinadas estructuras y/o funciones fisiológicas del feto, que representan momentos clave para un buen desarrollo temprano. En estas etapas, los genes desencadenan un papel muy importante, sin embargo, estudios en modelos animales y evidencias epidemiológicas en humanos<sup>1</sup>, muestran una importante influencia de las condiciones del ambiente intrauterino en este proceso, actuando incluso como factores limitantes del desarrollo. Entre estos factores encontramos principalmente el aporte de nutrientes y oxígeno. De esta manera, una restricción o un exceso de algunos nutrientes durante etapas críticas del desarrollo van a conducir a una serie de adaptaciones fisiológicas, metabólicas y/o hormonales en el feto. Se tratan de adaptaciones producidas en la vida fetal temprana en respuesta a un ambiente

adverso, conocidas como programación. La programación tiene el objetivo de permitir o maximizar la supervivencia del feto en un ambiente desfavorable, sin embargo, puede conllevar una importante repercusión a largo plazo, en su futura vida adulta<sup>2</sup>.

Concretamente, numerosas evidencias obtenidas tras estudios epidemiológicos en humanos y en modelos animales, muestran que las condiciones nutricionales a las que se somete el feto a lo largo de su desarrollo, tienen una elevada influencia sobre diversas enfermedades crónicas en su vida adulta<sup>3</sup>. Entre éstas pueden destacarse, principalmente, enfermedades cardiovasculares, obesidad, diabetes, etc., y son consecuencia de una programación temprana del organismo.

Las primeras observaciones se desencadenaron tras un estudio epidemiológico sobre las consecuencias de la hambruna holandesa que tuvo lugar durante la segunda guerra mundial<sup>4</sup>. En este estudio se demostró que los niños nacidos de madres que habían padecido una mala nutrición, concretamente una nutrición pobre, durante los dos primeros trimestres de gestación, eran más propensos a desarrollar obesidad en su vida adulta, respecto a individuos controles, sugiriendo de esta manera el origen fetal de esta patología.

A raíz de estos hallazgos, son muchos los estudios que se han realizado, y se continúan realizando actualmente, con el objetivo de conocer las causas y los factores por los que las alteraciones nutricionales durante el desarrollo fetal conducen a un mayor riesgo de padecer enfermedades crónicas en la vida adulta. Además, muchos de estos estudios están dirigidos a estudiar, concretamente, la programación de la obesidad, debido a que esta patología es, lamentablemente, una de las más comunes en nuestra sociedad.

## 2. Objetivos

---

La obesidad se trata de una patología de elevada prevalencia en la sociedad, relacionada también con múltiples complicaciones secundarias. Además, estudios predictivos indican que, con el paso del tiempo, el número de incidencias va a ir en aumento, dando lugar a una alarmante prevalencia de futuro que ha convertido a la obesidad en un importante foco de estudio.

El hecho de tratarse de una patología multifactorial relacionada tanto con factores genéticos como ambientales y que por tanto, su origen pueda iniciarse en etapas tempranas del desarrollo, ha conducido a que muchas investigaciones hayan sido encaminadas hacia el estudio de las posibles causas y factores implicados en la programación metabólica de esta patología durante la gestación, con el fin de encontrar terapias preventivas para la obesidad y poder así evitarla desde etapas tempranas.

Debido a la gran prevalencia de la obesidad en nuestra sociedad, los objetivos del presente trabajo incluyen realizar una revisión bibliográfica sobre el fenómeno de la programación metabólica temprana y sobre los posibles factores y condiciones que, durante la etapa gestacional, pudieran afectar al riesgo de padecer obesidad en la vida adulta. Concretamente, el trabajo se centra en los efectos de una restricción calórica durante la gestación, así como en el estudio de posibles estrategias que pudieran revertir los efectos de la programación.

Además, el presente trabajo también incluye un estudio experimental llevado a cabo en el laboratorio. Concretamente, se trata de un modelo de experimentación animal donde se someten a ratas gestantes a una restricción calórica moderada durante los 12 primeros días de gestación. El objetivo de dicho estudio es determinar, en las crías descendientes, si estas condiciones han tenido un efecto sobre el desarrollo del tejido adiposo blanco, debido a la relevancia de éste en el desarrollo de la obesidad. Para cumplir con dicho objetivo, a partir de muestras de tejido adiposo blanco retroperitoneal, se ha realizado la caracterización morfológica y la determinación de la expresión génica de tres genes de especial interés en el metabolismo de este tejido y en el control de las reservas grasas.

## 3. Revisión bibliográfica sobre la programación metabólica de la obesidad por alteraciones nutricionales durante la gestación

---

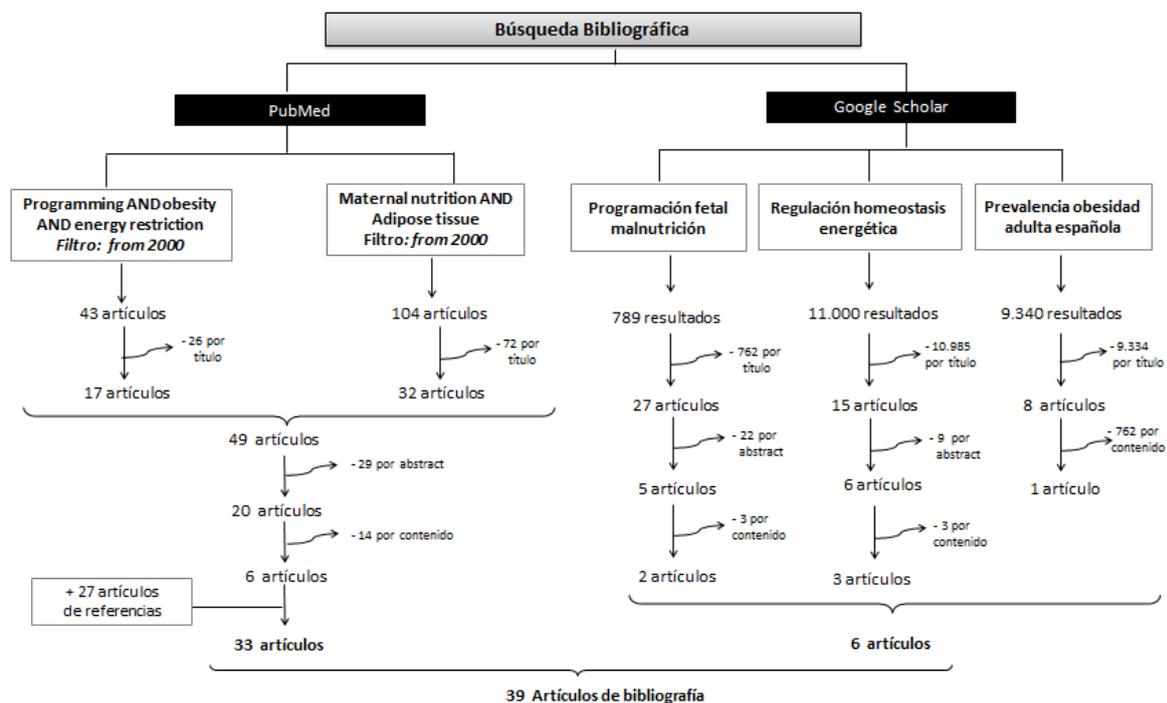
### 3.1. Búsqueda bibliográfica

Con el fin de abarcar los objetivos del trabajo, se ha llevado a cabo una exhaustiva búsqueda bibliográfica que puede encontrarse resumida en la figura 1.

En primer lugar, se comenzó realizando una primera búsqueda en la base de datos de PubMed para obtener una primera visión global acerca de las cuestiones a tratar en el trabajo. Para ello se utilizaron las palabras clave “Programming AND Obesity AND Energy restriction” y se restringió la búsqueda a aquellos artículos publicados a partir del año 2000. El resultado fueron 43 artículos, entre los cuales se seleccionaron 17 en función del título de éstos. Posteriormente, se realizó una segunda búsqueda en la misma base de datos para profundizar más en el tema, con las palabras clave: “Maternal undernutrition AND Adipose tissue” y, nuevamente, restringiendo la búsqueda a aquellos artículos publicados a partir del 2000. El resultado obtenido fueron 104 artículos, de manera que, según el título, se descartaron 72. Posteriormente, se procedió a leer los resúmenes de los 49 artículos seleccionados de ambas búsquedas. Entre éstos, únicamente 20 fueron seleccionados como artículos potencialmente útiles para la realización de trabajo. Sin embargo, tras la lectura completa de estos artículos, en función de su contenido total y por ser los de mayor relevancia para los temas a tratar, tan solo 6 fueron seleccionados como bibliografía. Además, es de destacar que, a partir de las referencias incluidas en estos 6 artículos, se seleccionaron 27 artículos más que permitían ampliar la información para determinados puntos más concretos.

Seguidamente se realizó una tercera búsqueda en la base de datos de Google Scholar con las palabras clave “Programación fetal malnutrición”. El resultado fue de 789 artículos organizados en 9 artículos por página. De esta manera, se hizo una revisión de las 5 primeras páginas de resultados y se seleccionaron, según el título, 27 artículos, de los cuales únicamente 5 resultaron ser potencialmente relevantes en función del *abstract*. No obstante, tras la lectura de estos 5 artículos, en función del contenido, se seleccionaron únicamente 2.

A partir de estas tres primeras búsquedas bibliográficas, se abarcó una gran cantidad de información para comenzar a redactar el trabajo. Sin embargo, fue necesario llevar a cabo dos búsquedas más en Google Scholar para obtener más información sobre dos temas en concreto: la prevalencia de la obesidad adulta en la población española y los mecanismos de regulación de la homeostasis energética. De esta manera, en una primera búsqueda se utilizaron las palabras clave “Regulación homeostasis energética” y en una segunda búsqueda “Prevalencia obesidad adulta española”. En ambos casos se revisaron los títulos de 3 páginas y posteriormente, se seleccionaron en función del *abstract* y del contenido, un total de 4 artículos.



**Figura 1.** Diagrama de la búsqueda bibliográfica llevada a cabo para obtener la información necesaria para la realización del trabajo.

Por tanto, para la elaboración de la parte bibliográfica de este trabajo se han utilizado finalmente 39 artículos científicos que han permitido tratar los temas necesarios para lograr los objetivos del trabajo.

## 3.2. Obesidad

Desde un punto de vista fisiológico, la obesidad se caracteriza por un incremento patológico de la grasa corporal, almacenada como tejido adiposo blanco, producido por un balance energético positivo. Esta patología se define como una enfermedad multifactorial, pues este desequilibrio energético puede ser debido tanto a factores ambientales (dieta, actividad física, etc.), como a factores genéticos. De esta manera, la respuesta de cada individuo a una determinada dieta o factores ambientales puede variar considerablemente en función de las características genéticas de sus mecanismos de control de peso corporal<sup>5,6</sup>.

Cuando se produce un balance energético positivo, como en el caso de la obesidad, la energía en exceso debe ser almacenada en forma de grasa. Para ello, se destacan dos procesos

distintos: la adipogénesis y la lipogénesis<sup>7</sup>. Por un lado, la adipogénesis se caracteriza por un incremento en el número de adipocitos por diferenciación y compromiso de las células madre adiposas. Esta diferenciación de preadipocitos a adipocitos está regulada por diversos factores de transcripción adipogénicos, como son los factores PPAR $\gamma$  (*peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$* ), CEBP $\alpha,\beta,\gamma$  (*CCAAT/enhancer binding protein*), SREBP1c (*sterol regulatory element-binding protein 1c*), entre otros. Por otro lado, la lipogénesis está caracterizada por un incremento en el tamaño de los adipocitos, que depende de la síntesis y almacenamiento de triglicéridos en los adipocitos maduros. A pesar de ser dos mecanismos diferentes, ambos procesos conducen finalmente, a un aumento del tejido adiposo.

### 3.2.1. Prevalencia de la obesidad

Uno de los estudios más recientes acerca de la prevalencia de la obesidad en nuestro país fue realizado en el año 2011<sup>8</sup>. Los resultados muestran una prevalencia del 13,6% en individuos entre 18 y 60 años, sin encontrarse diferencias entre sexos. Además, el mismo estudio indica que un 54,7% de la población presenta obesidad central y riesgo cardiovascular. Asimismo, España se encuentra en una posición intermedia respecto al resto de países, considerando la prevalencia a la obesidad en China de un 2,9% y en Estados Unidos de un 32,2%.

Además, en comparación con otros estudios realizados en años anteriores, la situación actual muestra un importante empeoramiento<sup>8</sup>. De esta manera, si no se toman medidas al respecto y se mantiene el mismo ritmo de crecimiento, se estima que en el año 2030 la población americana podría incluso llegar a presentar un 100% de obesidad. De la misma manera, para ese mismo año en España, se estima que la prevalencia en mujeres sea de un 37% y en hombres de un 33%.

Estos datos confirman la preocupación existente ante esta patología y el gran interés por parte de la comunidad científica en encontrar terapias preventivas desde las primeras etapas de vida.

## 3.3. Homeostasis energética: mecanismo de regulación del peso corporal

Debido a que la obesidad se trata de una enfermedad producida por una alteración en el balance energético, es esencial conocer en primer lugar el funcionamiento por el cual el organismo mantiene una homeostasis energética y poder, posteriormente, determinar las posibles modificaciones existentes en esta patología.

La homeostasis energética constituye un proceso de vital importancia en el organismo, pues permite el adecuado funcionamiento celular y el mantenimiento del equilibrio entre la energía almacenada y su catabolismo. El principal objetivo de esta regulación es permitir un crecimiento adecuado y mantener un peso apropiado a lo largo de las diferentes etapas de la vida<sup>9</sup>.

Para llevar a cabo la regulación del peso corporal en un organismo, es necesaria la coordinación de diferentes estructuras que incluyen desde el sistema nervioso, tanto central como periférico (concretamente el sistema simpático), hasta la participación de diferentes tejidos, destacando el papel del tejido adiposo como principal reservorio de energía en el organismo<sup>9</sup>.

En primer lugar, la implicación del sistema nervioso simpático (SNS) en el balance energético se basa principalmente en su papel a nivel de tejido adiposo blanco. Concretamente, la principal función del SNS en este tejido es la estimulación de la movilización de lípidos (lipólisis) y la regulación en la proliferación de los adipocitos. Este último efecto es mediado por la norepinefrina (NE), principal neurotransmisor en el tejido adiposo que actúa inhibiendo la proliferación de este tipo celular<sup>10, 11</sup>.

En segundo lugar, se destaca al sistema nervioso central por su función clave en la homeostasis energética. Esto es debido a que es el encargado de recibir las múltiples y constantes señales procedentes de tejidos periféricos que indican el estado energético del organismo. Concretamente, se resalta la función del hipotálamo como principal centro integrador de señales. Consecuentemente, esta estructura, situada en la base del cerebro, es la encargada de elaborar una respuesta adecuada, basada en cambios a nivel de metabolismo y de conducta, con el objetivo de mantener el balance energético en el organismo<sup>12</sup>.

El hipotálamo está formado por diversas áreas o núcleos que lo caracterizan: el núcleo arcuato (ARC), el núcleo paraventricular (PVN), el hipotálamo dorsomedial (DMH), el hipotálamo ventromedial (VMH) y las áreas hipotalámicas laterales (LHA)<sup>13</sup>. El núcleo arcuato es considerado el principal punto de recepción de las señales endocrinas transmitidas por la sangre. En éste podemos diferenciar dos poblaciones neuronales diferentes: aquellas que expresan neuropéptidos anorexígenos (con funciones catabólicas), como la proopiomelanocortina (POMC) y el péptido regulador de la transcripción de la cocaína y anfetamina (CART); y aquellas que expresan neuropéptidos orexígenos (con funciones anabólicas), como el neuropéptido Y (NPY) y la proteína relacionada con agouti (AgRP). La expresión de unos u otros, viene determinada por el tipo de señales que recibe el hipotálamo<sup>11</sup>.

No obstante, es importante destacar que además del núcleo arcuato, también es necesaria la participación y conexión de otros núcleos hipotalámicos y áreas del cerebro, como el tronco cerebral para lograr la homeostasis energética. De esta manera, existe una importante red de comunicaciones entre todas estas regiones, revelando la complejidad de este proceso<sup>9,11</sup>.

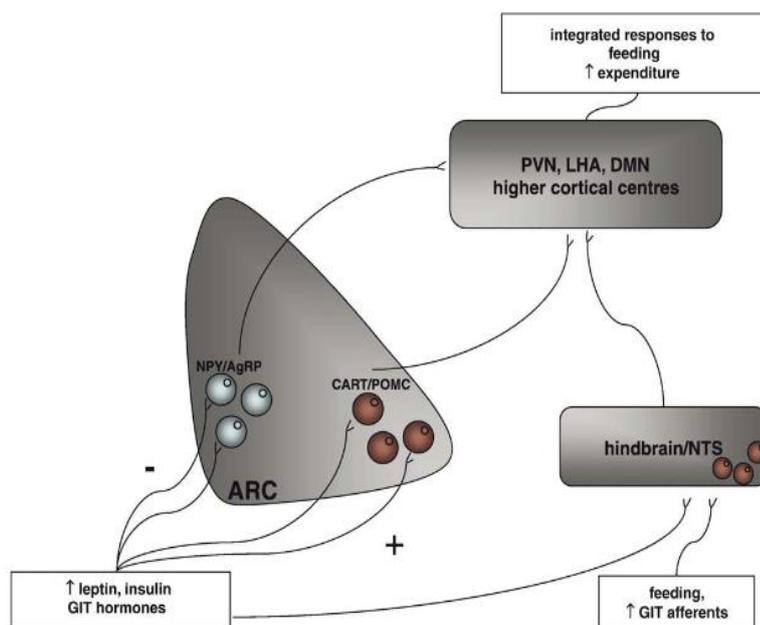
Hasta hace poco, la investigación sobre el balance energético y la obesidad estaba enfocada a las vías neuroendocrinas implicadas en la regulación hipotalámica de la homeostasis energética. Sin embargo, tras las evidencias del papel del tejido adiposo como órgano endocrino, este tejido se ha convertido en el centro de las investigaciones. Y es que, además de ser el principal reservorio de energía, el tejido adiposo blanco es un importante tejido endocrino que sintetiza un gran número de hormonas y citoquinas, denominadas con el nombre de adipoquinas, que participan en la regulación metabólica del organismo. Entre estas hormonas producidas por el tejido adiposo, la leptina es la de mayor relevancia en cuanto a la homeostasis energética<sup>6</sup>.

La leptina es una hormona peptídica de 167 aminoácidos codificada por el gen Ob, expresado principalmente por los adipocitos de manera proporcional al volumen de ácidos grasos acumulados en éstos. De esta manera, unos niveles circulantes de leptina altos revelan un estado energético elevado. Su principal función en la homeostasis energética es actuar a nivel de sistema nervioso central, modificando la conducta alimentaria y con ello, el balance energético. Para poder llevar a cabo esta acción, la leptina circulante debe en primer lugar atravesar la barrera hematoencefálica, a través de transportadores específicos, permitiendo así su circulación por el fluido cerebroespinal.

Posteriormente, la leptina actúa sobre el núcleo arcuato del hipotálamo gracias a la presencia de receptores específicos para la leptina (Ob-Rb). La interacción de la hormona con su receptor conduce a un incremento en la expresión de los neuropéptidos anorexígenos POMC y CART y a una reducción los niveles de los neuropéptidos orexígenos NPY y AgRP <sup>11</sup>.

Por una parte, los efectores catabólicos van a conducir a una reducción de la adiposidad a través de la inhibición del apetito y a la estimulación del gasto energético. Por otra parte, la disminución de los efectores anabólicos contribuye a la lipólisis del tejido adiposo. Concretamente, el NPY y la AgRp actúan estimulando la ingesta de alimentos. Por tanto, el efecto inhibitorio de la leptina sobre estos neuropéptidos contribuye a la disminución del apetito. Además, el NPY también ejerce un efecto inhibitorio sobre la termogénesis, por lo que una disminución en su expresión conlleva a un aumento de este proceso y por tanto, a un mayor gasto energético. De esta manera, los efectos de la leptina contribuyen finalmente a una disminución del peso corporal <sup>9,11</sup>.

Además, es importante recordar, como ya se ha comentado, que existe una importante conexión entre las diferentes áreas hipotalámicas. De esta manera, tras la llegada de la leptina al núcleo arcuato, sus efectos van a ser proyectados desde este núcleo hacia otras áreas hipotalámicas, donde se conduce finalmente a la elaboración de una respuesta adecuada. (Figura 2)



**Figura 2.** Representación esquemática de la regulación del balance energético en el sistema nervioso central. El aumento de los niveles circulantes de factores que indican un estado nutricional elevado, como la leptina, estimulan en el núcleo arcuato del hipotálamo (ARC) la producción de los neuropéptidos anorexígenos CART y POMC y la inhibición de los neuropéptidos orexígenos NPY y AgRP. Estas señales se proyectan desde el núcleo arcuato hacia otros núcleos del hipotálamo (PVN, LHA, DMN), donde se elabora una respuesta adecuada para modificar la ingesta e incrementar el gasto energético, manteniendo así un peso corporal estable. Como puede observarse, también hay una implicación de otras regiones cerebrales, como el tronco cerebral <sup>11</sup>.

Por tanto, podemos determinar que a través de la leptina, el hipotálamo desencadena una importante cascada de señales que ejercen un efecto regulador sobre el balance nutricional del organismo a través de la modulación de la ingesta y del metabolismo. Estos efectos han sido demostrados gracias a la realización de estudios basados en modelos de ratones deficientes en el gen codificante de la leptina (ratones ob/ob), donde se muestra que estos animales desarrollan un fenotipo obeso<sup>14</sup>.

De esta manera, si la leptina desarrolla un papel tan importante en el balance energético, puede esperarse que su función se vea alterada en la obesidad. Estudios en humanos han mostrado que, salvo en algunos casos, la producción de leptina no se ve afectada por esta patología, de manera que las alteraciones podrían ser debidas a fallos en el transporte de esta hormona hacia el fluido cerebroespinal, o bien en la señalización intracelular de la leptina, conduciendo de esta manera a una hiperleptinemia y resistencia a esta misma, principal característica de la obesidad<sup>14</sup>.

Por otro lado, es importante destacar a la insulina como otro factor indicativo importante del estado nutricional del organismo y que participa en el balance energético. Esta hormona es liberada en respuesta a una ingesta y su principal efecto en el sistema nervioso central, tras atravesar la barrera hematoencefálica, es contribuir a la regulación de la ingesta calórica. Concretamente, la insulina liberada tras un aporte de nutrientes actúa disminuyendo la ingesta. Este hecho ha sido comprobado mediante experimentos donde se observó que la disminución de los niveles cerebrales de insulina genera un aumento de peso<sup>9</sup>. Esto permitió clasificar a la insulina como agente anorexígeno. No obstante, podría resultar confuso el hecho de que la insulina es considerada como la principal hormona anabólica del organismo. Sin embargo, es lógico relacionar que tras una ingesta, la insulina almacena la energía en los diferentes depósitos del organismo, al mismo tiempo que indica al sistema nervioso central la presencia de suficiente energía para conducir a la inhibición de la ingesta.

Finalmente, debido a su papel como principal tejido de reserva energética, el tejido adiposo tiene también una importante implicación en la regulación del peso corporal. De esta manera, se han determinado efectos paracrin y autocrinos de la leptina sobre los adipocitos, a través de la presencia de su receptor (ObRb) en éstos. Concretamente, un estudio realizado en ratones suplementados con leptina<sup>15</sup>, demostró que esta hormona disminuye la tasa de síntesis de ácidos grasos y aumenta la actividad de las enzimas participantes en el ciclo de Krebs, contribuyendo a una mayor tasa de oxidación de glucosa y ácidos grasos, es decir, a un mayor gasto energético. Sin embargo, un estudio realizado *in vitro* con adipocitos humanos<sup>16</sup>, no mostró un aumento de la lipólisis en estas células, tal y como sí ocurre en ratones, pero sí se observó una disminución de la lipogénesis, posiblemente debido a una menor captación de glucosa, contribuyendo de igual modo a una menor adiposidad en el tejido.

Por tanto, la homeostasis energética y la regulación del peso corporal se trata de un complicado proceso muy bien regulado donde participan diversos factores y sistemas. Asimismo, es un importante campo de estudio, ya que interesa conocer su funcionamiento para posteriormente investigar posibles estrategias para solucionar alteraciones en este sistema, como ocurre en el caso de la obesidad.

### 3.4. Efectos de una malnutrición durante la gestación sobre el desarrollo fetal

Las investigaciones pioneras sobre el efecto que ejercen los factores nutricionales sobre el desarrollo fetal fueron de la mano de David J. P. Barker. Los resultados de dichos estudios mostraron que las condiciones nutricionales durante estadios críticos del desarrollo afectan a la susceptibilidad de padecer enfermedades crónicas en la vida adulta, lo que llevó a Barker a proponer la hipótesis del origen fetal de enfermedades del adulto<sup>17</sup>, entre las que se incluye la obesidad.

A pesar de ser la restricción calórica uno de los objetivos del presente trabajo, es importante tener en cuenta que al hablar de una malnutrición durante la gestación se incluye también, además de una privación de alimentos, un exceso de éstos. De esta manera, es interesante destacar también algunos de los efectos a los que puede conducir una sobrealimentación durante el desarrollo fetal.

Modelos experimentales en animales han demostrado que la obesidad durante la gestación induce una potenciación de la adipogénesis en las crías, a lo largo de su desarrollo, resultando en un mayor tejido adiposo<sup>7</sup>. Este hecho ha sido demostrado por una elevada expresión del factor adipogénico PPAR $\gamma$  y una baja expresión de correpresores de dicho factor.

También se han presentado diversos modelos experimentales basados en la inducción de obesidad, mediante dietas ricas en carbohidratos y grasas, a ratas embarazadas<sup>2</sup>. Los resultados muestran una descendencia con hiperfagia, disminución de la locomoción y elevada adiposidad abdominal y, a los tres meses de vida, hipertensión arterial, disminución de la masa muscular, disfunción endotelial y una hiperinsulinemia que conduce a una intolerancia a la glucosa aproximadamente a los 6 meses de vida.

Por otro lado, respecto a los estudios realizados en condiciones de restricción calórica durante la gestación, es de destacar aquellos llevados a cabo por Barker y su equipo a partir de estudios epidemiológicos en humanos<sup>1,17,18</sup>. La realización de estos estudios en diferentes áreas geográficas permitió a Barker establecer una fuerte relación entre unas condiciones de vida pobre a lo largo del embarazo y el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares en la vida adulta.

Las consecuencias que surgen tras someterse a estas condiciones son debidas, al menos en parte, a que durante los periodos críticos del desarrollo, la tasa de división celular es muy elevada. Por tanto, si se produce un déficit de nutrientes durante éstas, la tasa de división celular se verá disminuida de manera importante, afectando así al tamaño y contenido de ADN en las diferentes estructuras. Asimismo, también se producen otras consecuencias, como son alteraciones en la distribución de distintos tipos celulares, cambios en los patrones de retroalimentación hormonal, alteración en las actividades metabólicas, etc. Como consecuencia, se afecta de manera permanente a las estructuras y fisiología de algunos órganos y tejidos, como puede ser el páncreas endocrino, hígado, vasos sanguíneos, sistema nervioso, etc<sup>17,18</sup>.

Según se recoge en la hipótesis del fenotipo ahorrador<sup>19</sup>, propuesta por Barker y Hales en el 1992, esta serie de modificaciones y cambios metabólicos que se inician en el desarrollo de los diferentes sistemas, en respuesta a una ambiente subóptimo, tienen el objetivo de maximizar las posibilidades de supervivencia postnatal. Por tanto, estas adaptaciones son beneficiosas si las condiciones pobres continúan, sin embargo, si el ambiente postnatal se caracteriza por una nutrición

completa, en ese individuo aumentará el riesgo de padecer enfermedades como consecuencia de la programación temprana.

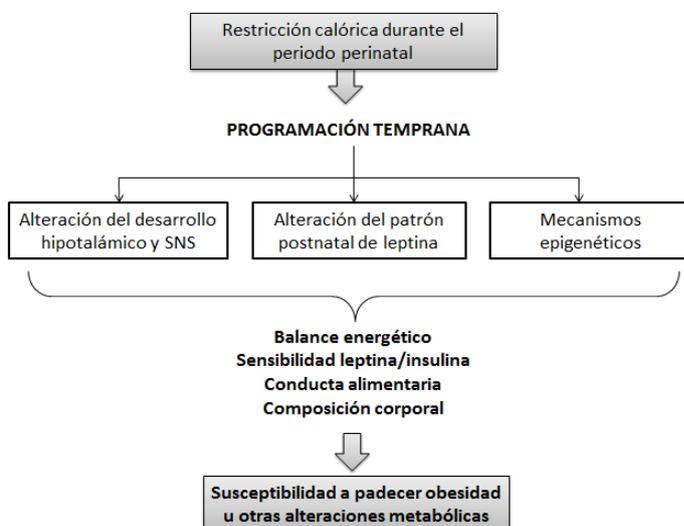
Así, diversos estudios muestran evidencias de que una privación de alimentos durante la gestación está relacionada con alteraciones a largo plazo en los sistemas que participan en la regulación de la energía<sup>10</sup>. De esta manera, se ha descrito que una restricción calórica moderada durante la primera mitad de la gestación programa a una descendencia caracterizada por una resistencia a la insulina y leptina. Como consecuencia, incrementa la propensión a desarrollar una excesiva adiposidad, especialmente cuando tras el nacimiento son expuestos a una dieta rica en grasa<sup>20</sup>.

Por tanto, determinar los mecanismos por los cuales una restricción calórica durante el desarrollo fetal conduce a esta programación metabólica, es actualmente uno de los principales focos de estudios, ya que conocer estos mecanismos abre un campo de investigación importante hacia posibles estrategias para prevenir la obesidad desde etapas tempranas.

### 3.5. Mecanismos de programación metabólica de la obesidad por restricción calórica durante la gestación

A día de hoy, los mecanismos por los que la nutrición materna conduce a la programación del riesgo de padecer obesidad en la descendencia no están completamente claros. Sin embargo, se pueden encontrar una serie de mecanismos que podrían ser potenciales sistemas de la programación de la obesidad. Entre éstos se encuentran: alteraciones en el desarrollo hipotalámico y en la inervación simpática del tejido adiposo blanco, la alteración de los niveles de leptina postnatales circulantes y alteraciones epigenéticas en genes de gran relevancia en el desarrollo de la obesidad<sup>7,13</sup>.

Como consecuencia de estos mecanismos, han sido descritas una serie de alteraciones producidas en el organismo que, conjuntamente, conducen a una mayor susceptibilidad de padecer obesidad. Entre éstas se pueden destacar: una alteración en el sistema regulador del balance energético, una modificación en la sensibilidad de los tejidos a la leptina e insulina, cambios en la conducta alimentaria y modificaciones en la composición corporal<sup>13</sup>. (Figura 3)



**Figura 3.** Diagrama esquemático que muestra la relación entre una restricción calórica durante el periodo perinatal y la predisposición a padecer obesidad u otras alteraciones metabólicas en la vida adulta. Figura adaptada de<sup>13</sup>.

### 3.5.1. Programación del hipotálamo y sistema nervioso simpático

El desarrollo del sistema nervioso central se caracteriza por una elevada plasticidad y sensibilidad a las señales metabólicas. Por este motivo, se ha sugerido que alteraciones nutricionales durante su desarrollo pueden conducir a importantes efectos en la función hipotalámica y con ello, en la regulación energética del organismo<sup>12</sup>.

Entre las alteraciones que pueden encontrarse a nivel de hipotálamo se incluyen: modificaciones en el tamaño de las áreas, en el número de neuronas que las conforman, en la interconexión entre las distintas regiones, en el tipo de neuronas y en la expresión de receptores para las diferentes hormonas y neuropéptidos.

Para demostrar estos efectos se han realizado estudios experimentales con animales, concretamente ratas, descendientes de madres sometidas a diferentes condiciones de restricción calórica durante la gestación. Algunos de estos estudios se caracterizaron por someter a las madres gestantes a una restricción calórica del 20% durante los 12 primeros días de embarazo<sup>13,21</sup>. Los resultados de éstos mostraron una disminución en el número de neuronas del núcleo arcuato, acompañado de una disminución de neuronas productoras de NPY y de una disminución en la expresión de POMC, AgRP y CART, así como también se observó una reducción de los receptores hipotalámicos para la leptina y la insulina. Por otro lado, una restricción calórica más severa, concretamente del 50%, resultó en un aumento de la proliferación celular en los núcleos hipotalámicos PVN, VMH y ARC, en una reducción de las proyecciones de POMC desde ARC a PVN, así como también en una disminución en la expresión del mismo neuropéptido en ARC<sup>22,23</sup>. De la misma manera que en el caso anterior, también se observó una reducción de los receptores hipotalámicos de la leptina, posible explicación de la resistencia a la leptina propia del fenotipo obeso.

No únicamente una restricción calórica durante la gestación conduce a alteraciones hipotalámicas, sino que una dieta desequilibrada también implica importantes modificaciones en este sistema. Concretamente, un estudio realizado en ratas descendientes de madres gestantes alimentadas con una dieta baja en proteínas (8% de la ingesta calórica) durante la gestación, resultó en un aumento del área VMH y una disminución del núcleo PVN<sup>24</sup>. Además, aumentó el número total de neuronas en estas dos regiones y disminuyó el número de neuronas productoras de NPY en el núcleo arcuato.

Por tanto, podemos concluir que existen alteraciones hipotalámicas importantes de diversa índole en función del tipo de restricción calórica a la que sea sometida la madre gestante. No obstante, los resultados predominantes son una respuesta orexígena, frente a las anorexígenas. Consecuentemente, se programa al organismo a un mayor riesgo de adiposidad.

Por otra parte, el sistema nervioso simpático es crucial en la regulación del tejido adiposo. De esta manera, alteraciones en éste a lo largo del desarrollo fetal puede constituir un potencial mecanismo de programación que involucra alteraciones en la adiposidad y en la capacidad de movilización de grasa en los animales adultos<sup>13</sup>.

En este aspecto, un estudio realizado sobre la descendencia de ratas sometidas a una restricción calórica moderada, del 20%, durante los 12 primeros días de gestación, mostró como consecuencia, efectos tempranos sobre la inervación simpática del tejido adiposo blanco<sup>10</sup>.

Concretamente, se realizó el estudio en dos depósitos de tejido adiposo blanco, el retroperitoneal y el inguinal, en crías de 6 meses de edad (consideradas adultas) expuestas a una dieta rica en grasas durante los dos últimos meses. Los resultados mostraron un mayor peso de los depósitos de tejido adiposo en las crías de restricción calórica respecto a los controles. Además, este mayor peso fue asociado, en el caso del tejido adiposo inguinal, a un aumento en el contenido de ADN, es decir, a un incremento en el número de células y no a un aumento del tamaño de los adipocitos. En cambio, en el tejido adiposo retroperitoneal, se observó que la tendencia al aumento de peso era debida a la presencia de adipocitos de un mayor diámetro, y no por un aumento en el número celular. Estos datos muestran, por tanto, que en la descendencia adulta de ratas sometidas a una restricción calórica moderada y expuestas a una dieta rica en grasas, se produce una hiperplasia del tejido adiposo inguinal y una hipertrofia del tejido adiposo retroperitoneal. Además, es importante destacar que en este estudio, dichas diferencias únicamente se observaron en machos, y no en hembras, lo que induce a pensar que éstas son más resistentes a la obesidad y desórdenes relacionados, posiblemente debido a factores hormonales.

Asimismo, este estudio explica que las alteraciones morfológicas observadas en el tejido adiposo inguinal, fueron debidas a una menor inervación simpática. Tal y como ya se ha comentado, la norepinefrina es el neurotransmisor que media esta inervación en el tejido adiposo y actúa inhibiendo la proliferación de los adipocitos. De esta manera, al producirse una menor inervación en este depósito, los niveles de este neurotransmisor disminuyen, conduciendo a una mayor proliferación celular<sup>13,10</sup>.

### 3.5.2. Alteración del patrón postnatal de leptina

Tal y como ya se ha comentado, la leptina ejerce un papel esencial en la regulación del balance energético. Además, hay que destacar que esta hormona es también requerida para conducir a un desarrollo neuronal normal, pues presenta una importante acción como factor neurotrófico en etapas tempranas de la vida. De esta manera, la leptina participa en el desarrollo de los circuitos hipotalámicos, principalmente en la formación de las proyecciones desde el núcleo arcuato hacia el resto de áreas hipotalámicas<sup>13,20</sup>.

La acción de la leptina en el desarrollo neuronal se pone de manifiesto por el gran incremento de sus niveles durante, aproximadamente, la segunda semana de vida. Concretamente, este aumento transitorio se ha descrito en roedores alrededor del décimo día de vida, coincidiendo con la maduración del hipotálamo, y es conocido como “oleada de leptina”<sup>20</sup>.

De esta manera, es lógico pensar que cualquier modificación en este aumento transitorio de leptina en la vida postnatal podría estar relacionado con alteraciones a largo plazo en el desarrollo hipotalámico y, por tanto, con una alteración en el sistema regulador de la homeostasis energética.

Estudios realizados en roedores en condiciones de restricción calórica materna durante los primeros 12 días de gestación, han resultado en una reducción e incluso ausencia de esta oleada de leptina, coincidiendo con alteraciones hipotalámicas. Entre estas alteraciones se destacan cambios en las proyecciones de POMC desde el ARC y alteraciones en la sensibilidad a la leptina e insulina<sup>20</sup>.

Por tanto, relacionando el efecto de la leptina sobre el desarrollo hipotalámico y el control del balance energético con las alteraciones observadas por modificaciones en la oleada de leptina en la vida posnatal, la alteración en los niveles de leptina ha sido propuesto como un importante mecanismo que puede contribuir a los efectos de la programación de la obesidad por una restricción calórica durante la gestación. Por este motivo, y como se tratará en el siguiente apartado, muchos investigadores se han planteado la administración postnatal de leptina como posible tratamiento para revertir estas alteraciones.

### 3.5.3. Mecanismos epigenéticos

Las alteraciones nutricionales durante la vida fetal también pueden conducir a cambios en la expresión génica vía mecanismos epigenéticos. Se puede definir epigenética como modificaciones heredables en la expresión génica que no están determinadas por la secuencia del ADN. Entre estas modificaciones se incluyen: alteraciones en el patrón de metilación de las islas CpG, localizadas principalmente en las secuencias de promotores génicos, y modificaciones covalentes en los aminoácidos terminales de las histonas como, metilaciones, fosforilaciones, acetilaciones, etc<sup>25</sup>. De esta manera, diferentes estados de modificación epigenética sobre una misma secuencia de ADN pueden conducir a una diferente expresión génica.

Debido a la susceptibilidad de los cambios epigenéticos durante la vida fetal, son considerados como posibles mediadores de los efectos a largo plazo que supone una programación nutricional temprana.

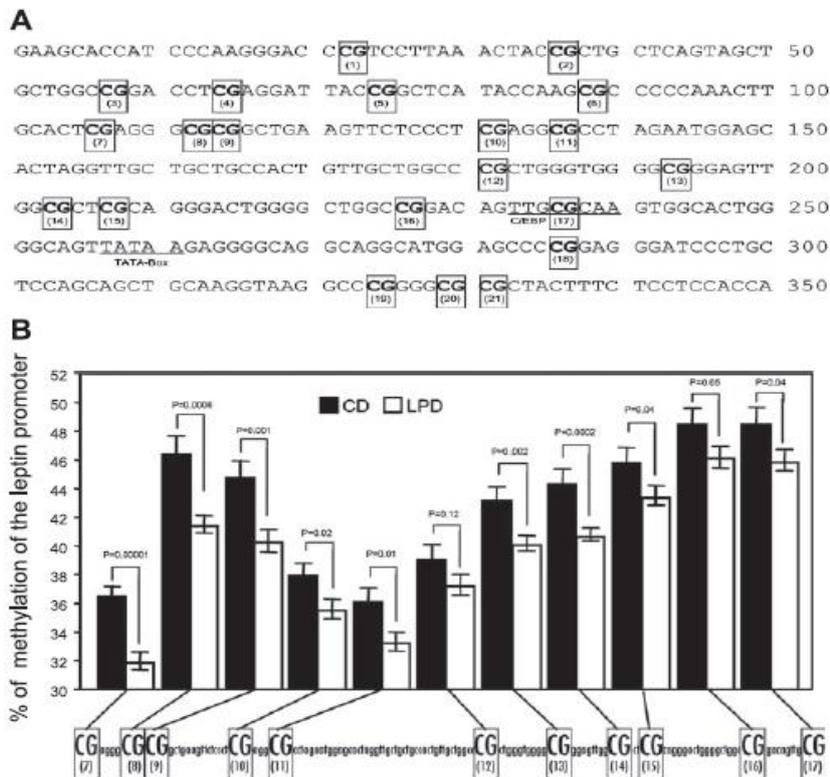
Se pueden encontrar diversos ejemplos que ponen de manifiesto el papel de la epigenética en la programación de la obesidad. Entre estos, un estudio de interés fue el realizado en ratones sometidos a una restricción calórica, basada en una dieta baja en proteínas (10% de la ingesta calórica), durante la gestación y lactancia<sup>26</sup>. Los resultados mostraron una hipometilación en las islas CpG del promotor génico de la leptina (*figura 4*). Esto señaló que en respuesta a una comida, en estos animales se induce más fuertemente la expresión de leptina que en los animales controles (alimentados con una dieta compuesta por un 22% de proteínas).

Asimismo, se pueden encontrar otros ejemplos (*véase* <sup>27,28,29</sup>) entre los que se destacan: modificaciones en el patrón epigenético de histonas localizadas en la región promotora del gen GLUT4, resultando en una represión génica de dicho gen, alteraciones en el patrón de metilación del gen POMC en respuestas a una dieta baja en proteínas y un diferente patrón de metilación en el gen codificante del factor de crecimiento insulínico 2 (Igf2, gen de gran relevancia en el desarrollo fetal) en individuos descendientes de madres afectadas por la hambruna holandesa.

Por otro lado, parece haber evidencias que indican que la leptina también tiene un efecto en el establecimiento de un determinado patrón de metilaciones en el ADN<sup>30</sup>. De hecho, se han encontrado diferencias en la metilación del promotor del gen POMC tras una suplementación con dosis fisiológicas de leptina durante la lactancia, efecto que parece tener un papel protector contra la ganancia de peso en adultos.

La epigenética se convierte así en otro potencial mecanismo por el cual la programación nutricional fetal conduce un mayor riesgo de padecer obesidad en la vida adulta. Sin embargo,

presenta una elevada complejidad y aún son necesarios multitud de estudios que realizar en este campo, con el objetivo de identificar los cambios epigenéticos predictores de este mayor riesgo de obesidad para así desarrollar posibles tratamientos para revertir o prevenir estos efectos<sup>25</sup>.



**Figura 4. A.** Secuencia génica del promotor de la leptina en ratones. Se señalan las islas CpG, susceptibles de modificación epigenética, numeradas del 1 al 21. **B.** Representación gráfica del nivel de metilación, en porcentaje, de algunas de las islas CpG, concretamente de la 7 a la 17, del promotor de la leptina. Se muestran las medias  $\pm$  la desviación estándar de los animales controles (CD) y animales sometidos a una restricción proteica (LPD)<sup>26</sup>.

### 3.6. El crecimiento compensatorio como sistema agravante de la programación metabólica de la obesidad

Como consecuencia de una restricción calórica materna durante la gestación, los bebés resultantes presentan una limitación en su crecimiento y son denominados bebés pequeños para su edad gestacional (SGA). Éstos son muy susceptibles a desarrollar patologías en su futura vida adulta, debido a que como ya se ha destacado, existe una importante interacción entre el desarrollo temprano y la exposición nutricional posterior<sup>11,31</sup>.

Tal y como ya contemplan Barker y Hales en la hipótesis del fenotipo ahorrador<sup>19</sup>, si un individuo ha sido sometido a un ambiente pobre de nutrientes durante su desarrollo fetal, pero en su vida postnatal es expuesto a un ambiente obesogénico, la programación a la que ha sido sometido este individuo durante la gestación se verá manifestada por un proceso de crecimiento compensatorio.

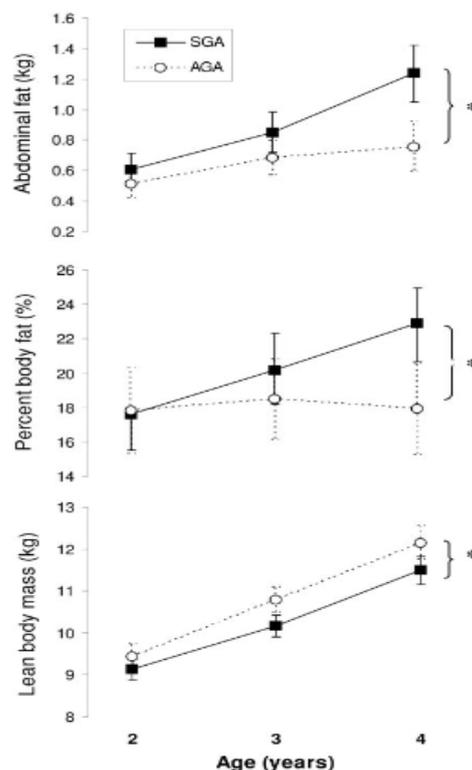
El crecimiento compensatorio o “*catch-up growth*” se trata de una respuesta fisiológica que restablece el crecimiento después de experimentar un periodo de restricción en el desarrollo. Sin embargo, debido a que el individuo ha sido programado para una vida nutricionalmente pobre, este sistema comporta a agravar el desarrollo de enfermedades metabólicas a largo plazo, principalmente obesidad<sup>11</sup>.

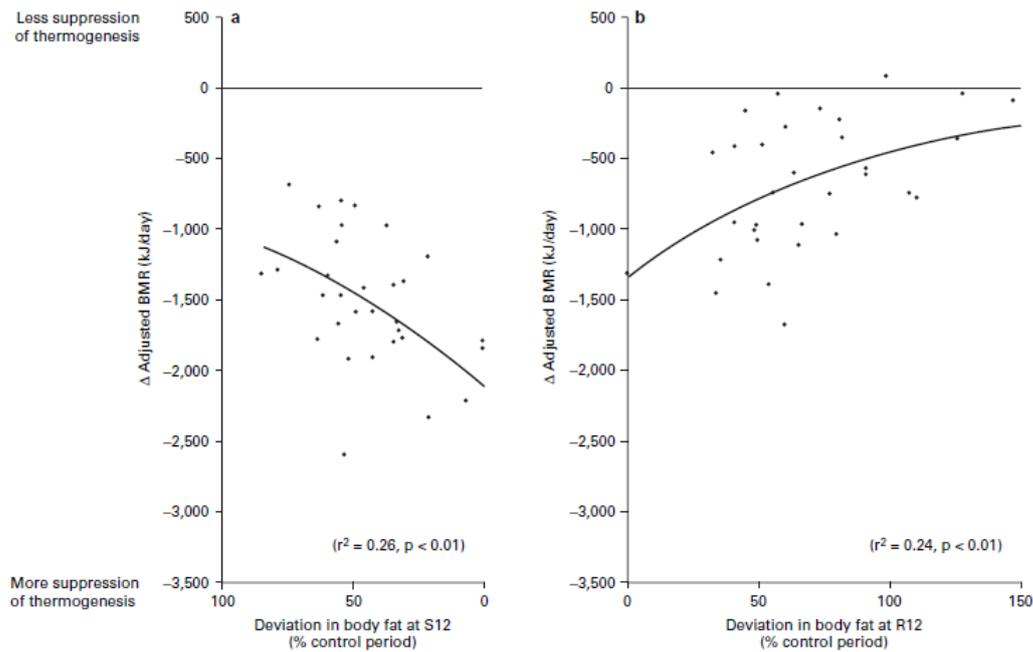
Numerosas evidencias apuntan a que el crecimiento compensatorio en niños SGA conlleva a un crecimiento desproporcionado del tejido adiposo respecto al tejido magro, motivo por el cual ha sido denominado como “*catch-up fat*” o recuperación de grasa acelerada. Concretamente, un estudio realizado en Barcelona ha revelado que estos niños presentan una mayor masa grasa, especialmente grasa abdominal, y una menor masa magra, respecto a niños nacidos con un tamaño y peso apropiados a su edad gestacional (AGA), para un mismo índice de masa corporal<sup>32</sup>. (Figura 5)

Además, estudios realizados en Finlandia e Inglaterra han demostrado que esta composición corporal se mantiene en la vida adulta, pues se observó que ancianos que habían nacido con una restricción en su desarrollo presentaban entre 3 y 5 kilos menos de masa magra y más masa grasa, respecto a ancianos nacidos con un desarrollo idóneo, para un mismo índice de masa corporal<sup>33,34</sup>.

El mecanismo por el cual el *catch-up fat* induce una mayor recuperación de masa grasa respecto a la magra, puede ser explicado por un incremento en la eficiencia del metabolismo, basado en una conservación de energía por inhibición de la termogénesis. Para demostrar la relación entre el tejido adiposo y la termogénesis, se utilizan las fuertes evidencias derivadas del experimento de Minnesota (*revisión de*<sup>31,35</sup>). En este estudio, 32 personas sanas con un peso corporal normal fueron sometidas a 24 semanas de ayuno seguido de 12 semanas de realimentación. Este estudio mostró que un mayor grado de depleción de los depósitos de grasa, resulta en una disminución del metabolismo basal por una supresión de la termogénesis. (Figura 6).

**Figura 5.** Representación gráfica de los cambios con la edad en la grasa abdominal, masa magra y porcentaje total de masa grasa en niños nacidos pequeños para su edad gestacional (SGA, n=29) y en niños nacidos con un peso apropiado para su edad gestacional (AGA, n=22). Se presentan las medias  $\pm$  desviaciones estándar para cada grupo. (\*)  $p < 0,05$  vs AGA.<sup>32</sup>





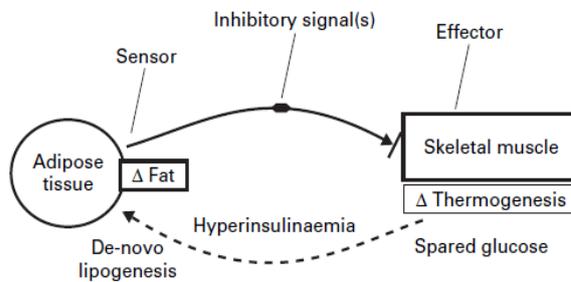
**Figura 6.** Experimento de Minnesota sobre humanos adultos sometidos a un periodo de ayuno seguido de un periodo de realimentación. Se muestra la relación entre la supresión de la termogénesis, medido por variaciones en el ratio metabólico basal (BMR), con cambios en la composición del tejido adiposo. **(a)** Periodo de 12 semanas de ayuno donde puede observarse una disminución en el contenido de masa grasa acompañado por una disminución del proceso de termogénesis. **(b)** Periodo de 12 semanas de realimentación donde puede observarse un aumento en el contenido de masa grasa acompañado por un aumento de la termogénesis.<sup>35</sup>

De esta manera, se demostró la relación existente entre la depleción de los depósitos de grasa y la supresión de la termogénesis. Este proceso es denominado “control de la termogénesis dependiente del tejido adiposo”<sup>31,35</sup>.

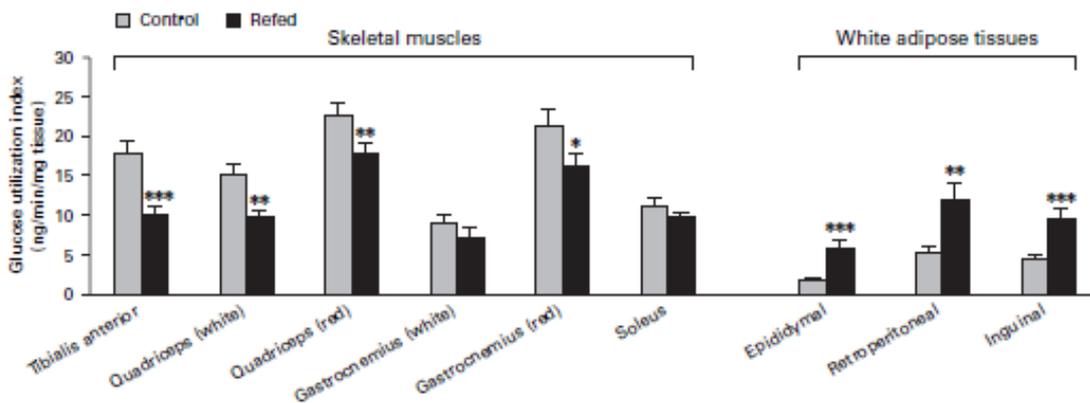
Por otro lado, es importante destacar el significativo papel del músculo esquelético en cuanto a la conservación de energía durante una temporada de falta de nutrientes. Por este motivo, cabe plantearse la existencia de un sistema de control en la supresión de la termogénesis dependiente del tejido adiposo, que actúe como un sistema de retroalimentación entre el tejido adiposo y el músculo esquelético. De hecho, diversos estudios han concluido que este sistema podría estar formado por un sensor del estado de los depósitos de grasa, por señales que transmitan la información entre ambos tejidos y por un sistema efector en el músculo esquelético que lleve a cabo la supresión o activación de la termogénesis, en función de la situación de estos depósitos<sup>31,35</sup>. (Figura 7).

Aunque actualmente aún quedan algunos componentes por determinar, estudios en modelos animales han permitido establecer la hipótesis de una redistribución de la glucosa como mecanismo por el cual el *catch-up fat* supone un incremento excesivo de tejido adiposo<sup>31,35</sup>. Estos estudios han mostrado que tras un periodo de realimentación, se produce una elevación de los niveles de insulina. Esto sugiere un estado de resistencia insulínica a nivel de músculo esquelético, lo

que conlleva a una situación de hiperinsulinemia. Sin embargo, en el tejido adiposo se ha observado un estado de hipersensibilidad a la insulina (*figura 8*) que, conjuntamente con una mayor actividad de la enzima ácido graso sintasa en este tejido, ha sugerido una potenciación de la conversión de la glucosa circulante tras la ingesta en lípidos.



**Figura 7.** Representación esquemática de la regulación del sistema de supresión de la termogénesis dependiente del tejido adiposo. El modelo propuesto está formado por un sensor que detecta el estado de depleción del tejido adiposo, señales que transmiten la información desde este tejido hacia el músculo esquelético, quien actúa como efector, modificando la tasa de termogénesis.<sup>35</sup>



**Figura 8.** Representación gráfica sobre la redistribución de la glucosa del músculo esquelético hacia el tejido adiposo tras una realimentación posterior a un periodo de ayuno. Se muestran las medias de los valores de utilización de glucosa en diferentes tejidos  $\pm$  sus desviaciones estándar para los animales control y los realimentados.<sup>35</sup>

Finalmente, a modo de conclusión, es de destacar que el mecanismo propuesto puede considerarse como un sistema que desenmascara los efectos de la programación temprana. Su objetivo es aumentar la supervivencia, pues permite un rápido aumento de los depósitos de grasa, sin embargo, en un contexto de vida moderna caracterizada por una baja actividad física y una dieta rica en alimentos energéticamente densos, conduce a efectos perjudiciales, dando lugar a una mayor adiposidad que se mantiene en la vida adulta<sup>35</sup>.

### 3.7. Estrategias para revertir los efectos de la programación

Ante las abundantes evidencias que demuestran el impacto de la nutrición materna sobre el riesgo de padecer enfermedades crónicas en la vida adulta de la descendencia, muchos investigadores han emprendido estudios hacia la determinación de posibles estrategias que puedan revertir dichos efectos desde etapas tempranas de la vida. El objetivo de estos estudios es por tanto,

prevenir la obesidad y enfermedades relacionadas en la futura vida adulta de los individuos caracterizados por una mala programación metabólica.

Para poder revertir los efectos de la programación es necesario que estas estrategias se lleven a cabo en etapas críticas de la vida fetal y/o neonatal, es decir, en periodos que se correspondan con el desarrollo y/o maduración de diferentes sistemas y sean así susceptibles de ejercer los efectos de cada estrategia y revertir la programación.

Como ya se ha comentado a lo largo del trabajo, uno de los potenciales mecanismos que conduce a una programación de la obesidad es la modificación epigenética que se producen durante el desarrollo fetal. De esta manera, es interesante plantearse si es posible revertir estas alteraciones debidas a una malnutrición durante la gestación. En este aspecto, un estudio realizado en ratas sometidas a una restricción proteica durante la gestación y suplementadas con ácido fólico, un dador de grupos metilo, mostró una prevención en cuanto a las modificaciones epigenéticas de diversos genes, entre ellos el PPAR $\gamma$ <sup>36</sup>.

Entre otras posibles estrategias, es de destacar un estudio que demuestra que una suplementación materna con colina puede prevenir la hipertensión inducida tras una restricción proteica materna durante la gestación<sup>37</sup>. Esto podría ser debido a que la colina es una vitamina que actúa disminuyendo la presión sanguínea y su síntesis se ve disminuida por efecto de una restricción proteica.

Por otro lado, existen evidencias que afirman que una desnutrición materna en ratas resulta en una disminución de la actividad física, conduciendo a una vida sedentaria en la descendencia. Concretamente, un estudio realizado en condiciones de restricción proteica materna durante la gestación mostró una disminución significativa en la actividad locomotora voluntaria en su progenie<sup>38</sup>. De esta manera, se ha sugerido que una actividad moderada de ejercicio es necesaria para prevenir las posibles alteraciones metabólicas en la descendencia.

Finalmente, debido a su relevancia como factor neurotrófico y regulador de la homeostasis energética, la suplementación con leptina en la vida postnatal es una importante estrategia de reversión, que cuenta con multitud de evidencias a favor de su eficacia. Como ya se ha comentado, se ha descrito en roedores que aproximadamente durante la segunda semana de vida, se produce una oleada de leptina que coincide con el desarrollo de los circuitos hipotalámicos. El origen de esta oleada de leptina es aún un tema de controversia, aunque se sugiere que la leptina neonatal proviene de la leche materna, a través de la lactancia, pues en ese periodo el tejido adiposo aun es inmaduro. Este hecho ha sido respaldado por la rápida disminución de los niveles de leptina en neonatos separados de la madre al nacer, así como por el mayor riesgo de padecer obesidad que presentan los niños alimentados por una fórmula lactante en lugar de la lactancia materna<sup>13,20,39</sup>.

Por tanto, una suplementación con leptina en este periodo, puede tener la capacidad de revertir algunos de los efectos neuroanatómicos y otras características del fenotipo obeso asociadas a la ausencia de la oleada de leptina. Concretamente, inyecciones intraperitoneales de dosis farmacológicas de leptina (10 mg/kg) entre el día 4 y 12 de vida en ratones deficientes en leptina (ratones ob/ob), han mostrado una reversión en el desarrollo alterado de las proyecciones del núcleo arcuato<sup>20</sup>; así como también, inyecciones diarias de leptina subcutánea (2.5 $\mu$ g/g/día) durante los 13 primeros días de vida en crías descendientes de ratas sometidas a una restricción calórica del 30%

durante la gestación, han mostrado una normalización en la ingesta calórica, actividad locomotora, peso corporal, masa grasa y en los niveles de glucosa, insulina y leptina en la vida adulta<sup>20</sup>.

Finalmente, también es importante destacar la existencia de un estudio que demuestra la efectividad de la administración de dosis orales de leptina a través de la lactancia, en cuanto a la reversión de una mala programación<sup>20</sup>. Este tratamiento fue administrado a crías de ratas descendientes de madres sometidas a una restricción calórica del 20% durante los 12 primeros días de embarazo, asociadas con alteraciones en los circuitos hipotalámicos como consecuencia de dichas condiciones. Concretamente, la suplementación consistía en administrar 1 ng de leptina el día 1 de vida a las crías e ir aumentando la dosis paulatinamente hasta alcanzar los 43,8 ng el día 20 de vida. Los resultados de dicho estudio mostraron que esta administración por vía oral de leptina durante la lactancia condujo a la reversión de las alteraciones neuroanatómicas, producidas como consecuencia de la restricción calórica materna.

De esta manera, se puede concluir que sí es posible revertir los efectos de la programación metabólica de la obesidad por una malnutrición materna durante la gestación. Esto es efectivo siempre y cuando los tratamientos se lleven a cabo durante periodos críticos, caracterizados por un desarrollo plástico, de tal modo que puedan ejercer un efecto en la futura vida adulta.

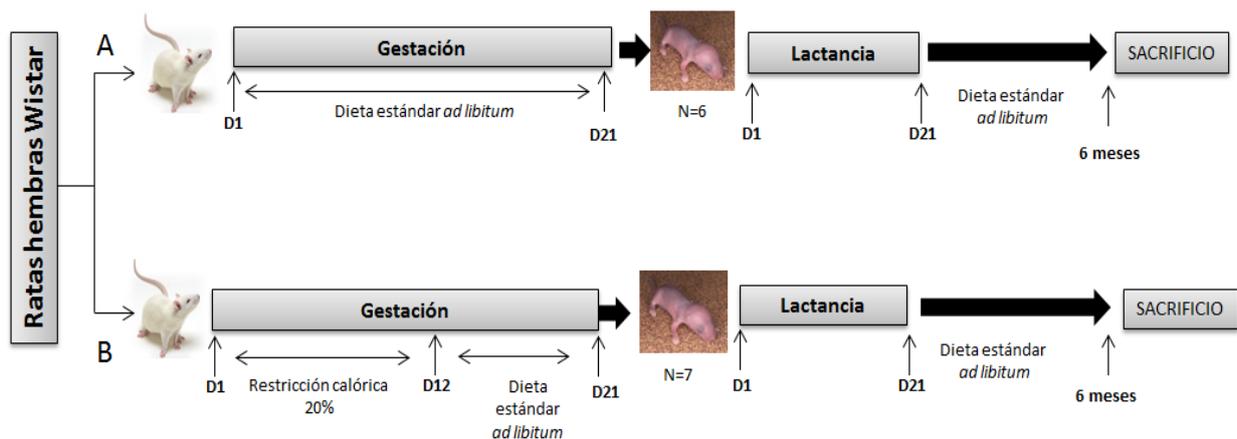
## 4. Estudio experimental

---

### 4.1. Diseño experimental

Con el fin de determinar el efecto de una restricción calórica moderada durante la gestación sobre el desarrollo del tejido adiposo blanco, concretamente sobre el depósito retroperitoneal, en la descendencia de madres gestantes sometidas a estas condiciones, se elaboró un protocolo de experimentación animal con ratas *Wistar*, revisado y aceptado por el comité ético de la Universidad de las Islas Baleares.

Concretamente, se trata de un estudio formado por dos grupos experimentales: crías de ratas descendientes de madres sometidas a una restricción calórica moderada durante la gestación (CR) y crías de ratas descendientes de madres alimentadas *ad libitum* durante la gestación (Controles). De esta manera, tras el embarazo de ratas hembras, se procedió a separarlas en dos grupos. Por una parte, unas fueron alimentadas *ad libitum* con una dieta estándar (3000 kcal/kg; Panlab, Barcelona, Spain) durante los 21 días de gestación, mientras que, por otra parte, las restantes fueron sometidas a una restricción calórica del 20%, en función de la ingesta de las controles, durante los 12 primeros días de gestación. Tras el nacimiento de la descendencia, ambos grupos experimentales fueron tratados en las mismas condiciones. Así, tanto las crías del grupo control como las crías del grupo de restricción fueron alimentadas mediante lactancia materna durante los 20 primeros días de vida. A partir del día 21, fueron destetadas y alimentadas con la misma dieta estándar *ad libitum*. Finalmente, fueron sacrificadas a los 6 meses de vida, edad a la que ya son consideradas como ratas adultas. (*Figura 9*)



**Figura 9.** Esquema del diseño experimental llevado a cabo para el estudio del efecto de la restricción calórica materna moderada durante la gestación sobre el desarrollo del tejido adiposo. **(A)** Grupo control; **(B)** Grupo de restricción calórica.

Con este modelo experimental se pretende estudiar los posibles efectos que ejerce la restricción calórica moderada durante el desarrollo fetal en la futura vida adulta, cuando estos animales son expuestos a una dieta equilibrada *ad libitum*. Para ello se llevaron a cabo una serie de determinaciones sobre el tejido adiposo retroperitoneal. En primer lugar, se extrajeron de cada animal los tejidos retroperitoneales y se procedió a pesarlos y, en segundo lugar, se obtuvieron muestras de dicho tejido para llevar a cabo todas las determinaciones pertinentes y poder determinar así los efectos de la restricción calórica en este tejido.

Por una parte se realizó la extracción del ARN para cuantificar la expresión de tres genes en importantes en el metabolismo del tejido adiposo y en el control de las reservas grasas: el gen del receptor de la leptina (ObRb), el factor adipogénico PPAR $\gamma$  y el gen que codifica para la enzima ATGL (*Adipose triglyceride lipase*), una lipasa de gran actividad en el tejido adiposo. Finalmente, también se utilizaron muestras del mismo tejido para realizar un estudio morfométrico y observar posibles alteraciones morfológicas. Concretamente, se llevó a cabo la determinación del área de los adipocitos.

Es importante destacar que para la realización del trabajo, la participación en el proceso experimental ha consistido en la colaboración durante el procesamiento de las muestras y sus respectivas determinaciones, y no durante el tratamiento y seguimiento de los animales. Además, para el presente trabajo únicamente se han seleccionado y estudiado las muestras procedentes de los animales de sexo masculino, de manera que el grupo de restricción calórica se formó a partir de muestras de 7 animales y el grupo control a partir de 6 animales, todos machos.

## 4.2. Materiales y métodos

### 4.2.1. Extracción de ARN

La obtención de ARN se realizó a partir de muestras de tejido adiposo blanco retroperitoneal mediante un método de extracción en columnas. Concretamente, el kit comercial utilizado fue el RNA kit I E.Z.N.A™ (Eazy Nuclei Acid Isolation) de la casa comercial Omega (Omega Bio-Tek, Inc., Norcross, GA, USA) y se siguió su protocolo experimental. El RNA aislado se cuantificó mediante el NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) y se procedió a diluir todas las muestras a una concentración final de 30 ng/mL. Finalmente, para comprobar la integridad del ARN, se realizó un gel de agarosa al 1%.

### 4.2.2. Retrotranscripción de RNA a ADNc

Tras la obtención de un ARN puro, se procedió a realizar una retrotranscripción para obtener así el ADNc. En primer lugar se desnaturalizaron 0,25 µg de ARN de cada muestra en un volumen final de 5 µL, a 65 °C durante 10 minutos. Posteriormente se preparó una solución con los 5 µL del producto desnaturalizado y 7,5 µL de RT-mix, cuyos componentes se describen en la tabla 1. Finalmente, para llevar a cabo la retrotranscripción se introdujeron todas las muestras en el termociclador Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystem, Madrid, Spain) siguiendo el siguiente programa: 20 °C durante 15 minutos, 42 °C durante 30 minutos y, finalmente, 95 °C durante 5 minutos.

Componente	Cantidad (µL)
Buffer de reacción	1,25
MgCl <sub>2</sub> 25mM	1,25
dNTPs 25 mM	2
Hexámeros aleatorios	0,5
Inhibidores RNasa y DNAsa	0,5
Retrotranscriptasa inversa	0,5
H <sub>2</sub> O libre de RNasa y DNAsa	1,5

**Tabla 1.** Componentes de la solución RT-Mix utilizada para llevar a cabo la retrotranscripción de ARN a ADNc. Las cantidades mostradas son las indicadas para una única muestra.

### 4.2.3. PCR cuantitativa a tiempo real

Una vez obtenido el ADNc se procedió a cuantificar la expresión del ARNm de los genes ObRb, ATGL y PPAR $\gamma$ , así como también la del gen GDI, utilizado como gen de referencia. Para ello se realizó una PCR cuantitativa a tiempo real. En primer lugar se diluyeron las muestras a una concentración 1/20 y se preparó una solución con 2 µL de muestra y 9 µL de SyberGreen-mix (Tabla 2). Las secuencias de los *primers* utilizados para amplificar cada gen se muestran en la tabla 3. Todos los *primers* fueron obtenidos de Sigma (Madrid, Spain).

Posteriormente se introdujeron las muestras en el Applied Biosystems StepOne-Plus™ Real-Time Systems (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: 10 minutos a 65 °C; 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto; y 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C y 15 segundos a 95°C para obtener la curva de *melting*.

Para la obtención de la Ct se hizo uso del software StepOne v2.0 y finalmente, para determinar la expresión génica de cada gen de interés, se utilizó la fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ <sup>40</sup>, utilizando el gen de referencia GDI para corregir la expresión de cada gen analizado.

Componente	Cantidad (μL)
Power SyberGreen	5
Forward primer (5 mM)	0,45
Reverse primer (5 mM)	0,45
H <sub>2</sub> O libre de RNAsa	3,1

**Tabla 2.** Componentes de la solución SyberGreen-mix utilizada para llevar a cabo la PCR a tiempo real. Las cantidades mostradas son las indicadas para una única muestra.

**Tabla 3.** Secuencia nucleotídica de los *primers* utilizados para la amplificación de cada gen y tamaño del amplicón.

Gen	Forward primer (5' a 3')	Reverse primer (5' a 3')	Amplicón (pb)
<b>GDI</b>	CCGCACAAGGCAAATACATC	GACTCTCTGAACCGTCATCAA	159
<b>ObRb</b>	AGCCAAACAAAAGCACCATT	TCCTGAGCCATCCAGTCTCT	174
<b>ATGL</b>	TGTGGCCTCATTCTCTAC	AGCCCTGTTTGCACATCTCT	271
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	GATCCTCCTGTTGACCCAGA	TCAAAGGAATGGGAGTGGTC	164

#### 4.2.4. Análisis morfométrico.

Para el estudio morfométrico del tejido adiposo retroperitoneal se realizó una inclusión en parafina de una muestra de dicho tejido. Este protocolo comienza con una deshidratación del tejido en una batería de etanol de graduación ascendente, seguido de un aclarado en xileno. Posteriormente, la muestra deshidratada puede ser incluida en parafina. Por último, se realizaron cortes del tejido de 5 μm mediante un microtomo y se realizó una tinción eosina- hematoxilina, previa eliminación de parafina.

Finalmente se obtuvieron 2 fotografías por cada muestra de animal experimental mediante microscopía óptica a 20 aumentos y se analizó el área de los adipocitos utilizando el software AxioVision40V 4.6.3.0 (Carl Zeiss, Imaging Solutios GmbH, Germany).

#### 4.2.5. Análisis estadístico.

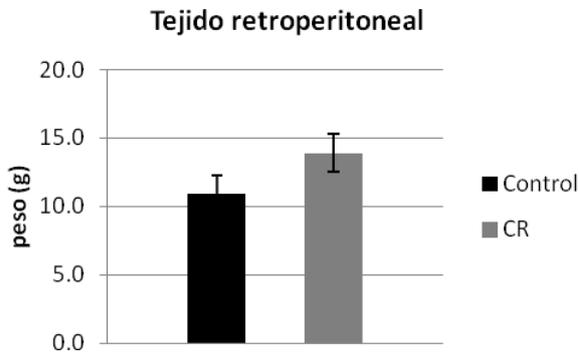
Los resultados obtenidos se representan en gráficos con los valores medios de cada grupo experimental junto con su error estándar. Para llevar a cabo el análisis estadístico se utilizó el test de la T de Student ( $p < 0,05$ ) y poder determinar así si los resultados obtenidos resultan ser significativos o no. Para ello se hizo uso del software IBM SPSS Statistics v22.

### 4.3. Resultados

#### 4.3.1. Pesos tejido adiposo retroperitoneal

En la figura 9 pueden verse representados los pesos medios del tejido retroperitoneal para cada grupo experimental. Tal y como puede observarse, este peso muestra una tendencia a ser

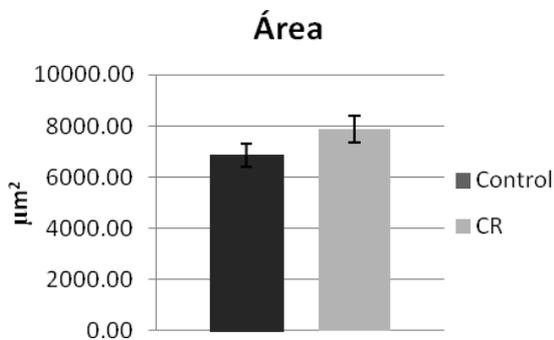
mayor en el grupo de restricción calórica respecto al grupo control, aunque la diferencia entre ellos no puede considerarse significativa ( $P=0,239$ ).



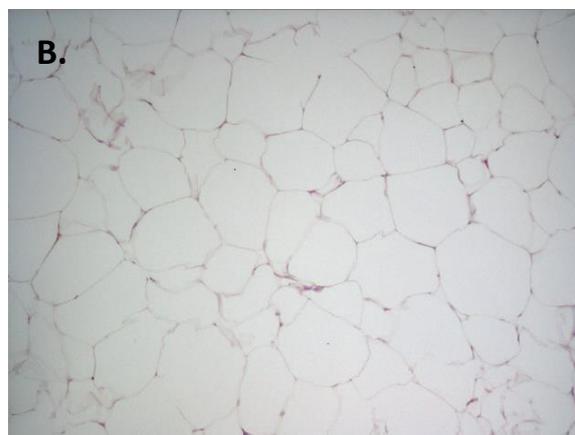
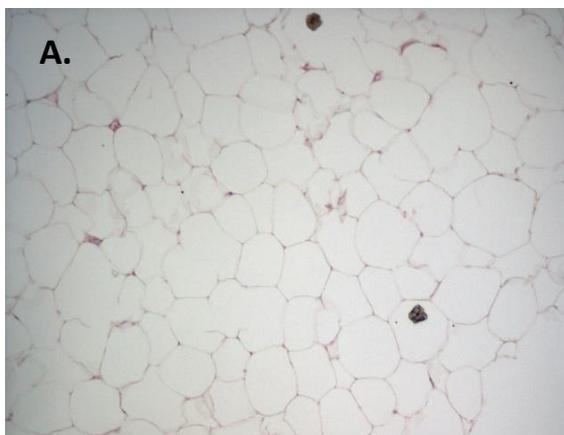
**Figura 9.** Representación gráfica del peso del tejido adiposo retroperitoneal en ambos grupos experimentales, control y restricción calórica (CR) durante la gestación. Se presentan los valores medios de cada grupo  $\pm$  su error estándar.

### 4.3.2. Análisis morfométrico

Los resultados de la determinación del área de los adipocitos de cada grupo experimental se representan en la figura 10. Como puede observarse, en los animales de restricción, esta área presenta una tendencia a ser mayor respecto a los controles, aunque esta diferencia no puede considerarse significativa ( $P=0,239$ ). Por otro lado, en la figura 11 puede observarse una fotografía representativa del tejido adiposo retroperitoneal de cada grupo, donde puede apreciarse que el tamaño de los adipocitos en el grupo de restricción es ligeramente mayor al grupo control.



**Figura 10.** Representación gráfica del área de los adipocitos en el tejido adiposo retroperitoneal para ambos grupos experimentales. Se presentan los valores medios de cada grupo  $\pm$  su error estándar.

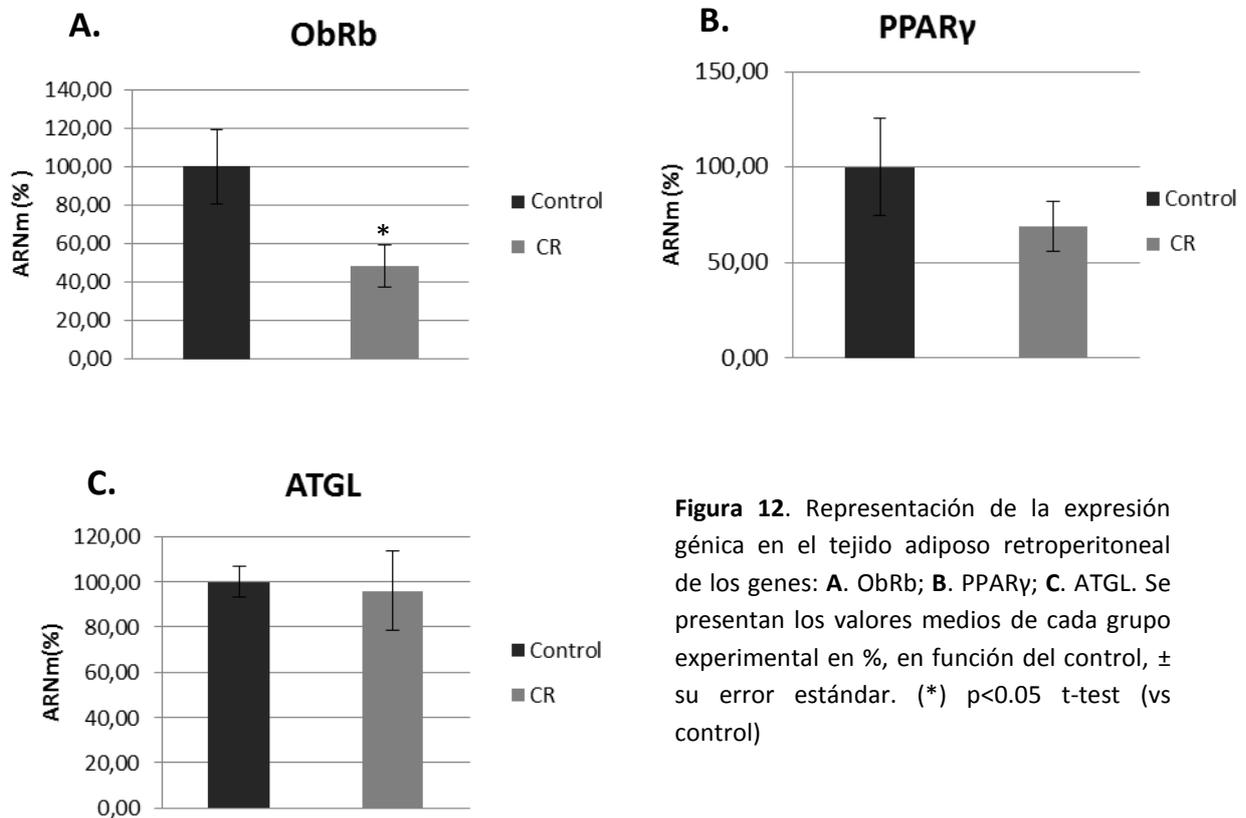


**Figura 11.** Imágenes de microscopía óptica del tejido retroperitoneal obtenidas a 20 aumentos y teñidas con eosina-hematoxilina. (A) Control; (B) Restricción calórica

### 4.3.3. Expresión génica de GDI, ObRb, ATGL y PPAR $\gamma$

En la figura 12 se representan gráficamente los resultados de la expresión génica de los 3 genes de interés analizados en el tejido adiposo retroperitoneal de ambos grupos experimentales. Dicha expresión ha sido corregida en función del *housekeeping* GDI, cuyos valores de Ct han resultado ser  $25,11 \pm 0,15$  y  $25,27 \pm 0,16$  para el grupo control y restricción calórica, respectivamente. Como puede observarse, la expresión del gen GDI no se ve modificada por el efecto de la restricción calórica y puede utilizarse para corregir la expresión de los genes de interés.

Por otro lado, en cuanto a la expresión del ARNm del receptor de la leptina (ObRb), puede destacarse una disminución en el grupo de restricción calórica respecto al grupo control, siendo además significativa ( $p=0,032$ ). En cuanto a la expresión del factor adipogénico PPAR $\gamma$ , se observa en una cierta tendencia no significativa ( $P=0,281$ ) a una menor expresión en los grupos de restricción respecto a los controles. Finalmente, no se muestra ninguna variación en la expresión génica de la lipasa ATGL ( $P=0,842$ ).



**Figura 12.** Representación de la expresión génica en el tejido adiposo retroperitoneal de los genes: **A.** ObRb; **B.** PPAR $\gamma$ ; **C.** ATGL. Se presentan los valores medios de cada grupo experimental en %, en función del control,  $\pm$  su error estándar. (\*)  $p < 0.05$  t-test (vs control)

### 4.4. Discusión

En este estudio experimental se han determinado una serie de parámetros importantes en el desarrollo y regulación del tejido adiposo que podrían verse influenciados por el efecto de una restricción calórica durante la gestación, ya que esta condición ha sido relacionada con una mayor propensión a la obesidad. De esta manera, mediante el diseño experimental llevado a cabo en el

laboratorio y los resultados obtenidos, se procede a evaluar si la restricción calórica moderada durante la gestación conduce a alteraciones a nivel metabólico y morfológico en este tejido, en crías de ratas sometidas a esta condición.

El factor PPAR $\gamma$  es miembro de una superfamilia de receptores nucleares de gran relevancia en el tejido adiposo blanco<sup>41</sup>. En este tejido, la activación de dicho factor conduce a la expresión de genes involucrados en la diferenciación de adipocitos, en el metabolismo lipídico y en la homeostasis de la glucosa, así como también conduce a una mayor expresión de adipoquinas que contribuyen a una mayor sensibilidad a la insulina en diferentes tejidos. Según los resultados obtenidos en el laboratorio, en las crías descendientes de ratas sometidas a una restricción calórica del 20% durante la gestación, aunque no resulta ser significativa, se muestra una tendencia a una menor expresión del gen que codifica para el factor PPAR $\gamma$ , respecto a los animales controles. Es importante tener en cuenta que la expresión de este gen se encuentra inducida por la insulina, de esta manera se podría sugerir que la señalización de esta hormona en estos animales podría estar alterada. Por tanto, la tendencia a la menor expresión del factor PPAR $\gamma$  puede ser debida a una situación de resistencia a la insulina, provocada por los efectos de la restricción calórica a la que han sido sometidas las madres gestantes. Además, una menor expresión de PPAR $\gamma$  conlleva a interpretar que en estos animales, la actividad de este factor podría ser menor, de manera que en relación a las funciones que cumple PPAR $\gamma$  en el tejido adiposo, puede sugerirse que se van a producir alteraciones en la homeostasis de la glucosa, en el metabolismo lipídico, en la diferenciación de adipocitos y en la sensibilidad a la insulina, contribuyendo al estado de resistencia insulínica.

Por otro lado, es de destacar que la restricción calórica materna sí ha provocado un efecto significativo sobre la expresión del gen que codifica para el receptor de la leptina en el tejido adiposo retroperitoneal. Concretamente, se encuentra una menor expresión de dicho gen en las crías descendientes de los animales sometidos a estas condiciones, respecto a los controles. Esta menor expresión de receptores sugiere que, en estos animales, se desencadena una situación de resistencia a la leptina que puede desencadenar el fenotipo obeso. Esta tendencia a una menor expresión del gen ObRb ha sido también obtenida en un estudio realizado en unas mismas condiciones de restricción calórica (un 20% durante los 12 primeros días de embarazo en ratas gestantes)<sup>42</sup>. Por otra parte, el hecho de que la expresión de los receptores de la leptina sea menor en estos animales, sugiere pensar que la actividad de esta hormona puede encontrarse disminuida. Conociendo que el papel de la leptina en el tejido adiposo de roedores es disminuir la tasa de síntesis de ácidos grasos y aumentar la tasa de oxidación de éstos, así como también de la glucosa, una menor actividad de esta hormona podría conducir a una mayor acumulación de grasa y por tanto, a unos adipocitos de mayor tamaño.

De hecho, esto podría correlacionarse con los datos obtenidos sobre el peso del tejido retroperitoneal. Los resultados muestran que el peso del tejido adiposo retroperitoneal presenta una tendencia a ser mayor en los animales descendientes de madres sometidas a la restricción calórica durante la gestación respecto a los animales controles. Esto puede ser observado también a través de las imágenes obtenidas por microscopía óptica. Sin embargo, teniendo en cuenta que estos resultados no son significativos y que no se ha realizado la determinación de los niveles circulantes de leptina, únicamente puede sugerirse que en función de la tendencia al mayor tamaño de los adipocitos y a la disminución significativa en la expresión del gen ObRb, los animales descendientes

de madres sometidas a la restricción calórica podrían caracterizarse por una resistencia a la leptina que podría conducir a una mayor adiposidad.

Finalmente, respecto a la expresión del gen que codifica para la enzima ATGL, los resultados obtenidos muestran que el efecto de la restricción no ha modificado la expresión de dicho gen. La enzima ATGL es una lipasa que se encuentra en la superficie de los adipocitos y que lleva a cabo la hidrólisis de los triglicéridos (TAG) contenidos en éstos, a diacilglicerol (DAG) y ácido graso libre (AG), primer paso de la lipólisis en este tejido, cuyo objetivo es proporcionar energía en situaciones en que ésta sea requerida<sup>43</sup>. Por tanto, es importante destacar que el estudio experimental que se ha llevado a cabo se ha realizado en condiciones de alimentación *ad libitum* en las crías, tras su nacimiento y periodo de lactancia. Por tanto, podría sugerirse que el motivo por el cual la restricción calórica no ha inducido cambios en la expresión de esta enzima sea debido a que en estos animales no se ha producido una situación de déficit de energía, como podría ocurrir por ejemplo, en una situación de ayuno. De esta manera, en las condiciones en que se ha realizado el presente estudio no se puede afirmar que se hayan encontrado alteraciones en la expresión de dicha enzima, aunque no se podrían descartar efectos de la restricción sobre ésta en otras condiciones.

Por tanto, en base a los resultados obtenidos, puede concluirse que la restricción calórica a la que han sido sometidas las ratas gestantes en este estudio ha resultado en una reducción significativa de la expresión del gen codificante para el receptor de la leptina, hecho que sugiere pensar en una situación de resistencia a esta hormona y, consecuentemente, a una mayor adiposidad. Además, los datos obtenidos sobre la expresión del factor PPAR $\gamma$  sugieren que en estos animales también se podría conducir a una situación de resistencia a la insulina. Tanto la insulina como la leptina son dos hormonas que presentan un papel clave en la regulación de la homeostasis energética y la resistencia a éstas ha sido descrita en el fenotipo obeso. Por otro lado, en las condiciones en que se ha realizado el estudio experimental no han podido determinarse cambios en la expresión del gen ATGL.

Finalmente, a pesar de que algunos de los resultados obtenidos no han resultado ser significativos, se pueden percibir una serie de alteraciones en el metabolismo y morfología del tejido adiposo que sugieren una mala programación metabólica en respuesta a una restricción calórica durante la gestación que conduce a un mayor riesgo de padecer obesidad, al menos en condiciones en que el aporte de nutrientes en la vida posnatal y adulta ha sido óptimo.

## 5. Conclusiones

---

Una vez realizada la revisión bibliográfica del presente trabajo, se puede concluir que el periodo fetal es una etapa crítica del desarrollo guiada por genes pero altamente influenciada por el ambiente uterino de la gestante. De esta manera, una alteración en la nutrición materna durante esta etapa, puede conducir a importantes efectos sobre el desarrollo fetal. Entre las alteraciones que se pueden producir a lo largo de este periodo, en respuesta a un ambiente desfavorable, incluyen modificaciones funcionales y/o morfológicas de diversos sistemas del organismo. Estas alteraciones son debidas al fenómeno de la programación metabólica, cuyo objetivo es asegurar la adaptación y supervivencia del feto en ese entorno. Sin embargo, si en la vida postnatal de la descendencia se

restablecen unas condiciones de vida óptima, la programación resulta en un aumento del riesgo de padecer enfermedades crónicas en la vida adulta, entre las que se incluye la obesidad.

Entre las alteraciones nutricionales a las que puede someterse una madre gestante se encuentra la restricción calórica. Esta condición va a suponer un importante impacto en el desarrollo del feto, especialmente si tiene lugar durante etapas que coinciden con el desarrollo de determinadas estructuras y/o funciones fisiológicas. Uno de los principales sistemas que resulta ser afectado por una restricción calórica durante la gestación es el sistema nervioso, tanto central como periférico. Debido a su relevancia en la regulación de la homeostasis energética y en el control del peso corporal del organismo, la alteración de este sistema es una de las razones principales por las que la restricción calórica programa al organismo a un mayor riesgo de padecer obesidad. Además, hay evidencias de que la restricción calórica también conduce a alteraciones en los niveles postnatales de la leptina, hormona producida por el tejido adiposo que también desencadena un papel esencial en el balance energético y en el desarrollo hipotalámico. Por tanto, una alteración en este sentido es también considerado como un potencial mecanismo de la mala programación metabólica. Asimismo también han sido identificadas modificaciones epigenéticas en genes clave de la regulación energética y del metabolismo como potenciales mecanismos de la programación.

Debido a la elevada prevalencia de la obesidad en nuestra sociedad y los hallazgos acerca del origen de esta patología en la vida fetal como consecuencia de la programación temprana, se han incrementado las investigaciones destinadas a encontrar estrategias para revertir los efectos de la programación y prevenir la obesidad desde etapas tempranas. En este aspecto, la suplementación con leptina en la vida postnatal parece ser un potencial sistema de reversión de eficacia comprobada.

Por otro lado, debido a su principal función como reserva energética en el organismo, no debe olvidarse el papel del tejido adiposo en la homeostasis energética y regulación del peso corporal. Para ello, la realización del estudio experimental en un modelo animal utilizando ratas *Wistar* gestantes sometidas a una restricción calórica del 20% durante los 12 primeros días de embarazo, ha permitido concluir que estas condiciones han tenido un efecto sobre algunos parámetros importantes de este tejido, en la descendencia de estos animales a una edad de 6 meses, considerada edad adulta, y en condiciones de alimentación *ad libitum*. Concretamente, en función de los resultados obtenidos se sugiere una situación de resistencia a leptina y posiblemente también a la insulina, principales características que conducen al desarrollo de un fenotipo obeso, mostrando así que la restricción calórica sí ejerce efectos sobre este tejido a través de una mala programación durante el desarrollo fetal de estos animales.

## 6. Referencias bibliográficas

---

1. Vargas Serna G. Fetal origins of adult disease. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2006;11(2):73-78. <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L43295598> <http://dx.doi.org/10.1016/j.siny.2005.11.001> <http://rug.on.worldcat.org/atoztitles/link/?sid=EMBASE&issn=1744165X&id=doi:10.1016/j.siny.2005.11.001&atitle=Fetal+origins>.
2. Garibay-Nieto N, Miranda-Lora AL. Impacto de la programación fetal y la nutrición durante el primer año de vida en el desarrollo de obesidad y sus complicaciones. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 65(6):451-467. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1665-11462008000600006&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-11462008000600006&lng=es&nrm=iso&tlng=es). Accessed May 14, 2016.
3. Pico C, Palou A. Perinatal programming of obesity: an introduction to the topic. *Front Physiol.* 2013;4:255. doi:10.3389/fphys.2013.00255.
4. Ravelli GP, Stein ZA, Susser MW. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med.* 1976;295(7):349-353. doi:10.1056/NEJM197608122950701.
5. Villaseñor A. El papel de la leptina en el desarrollo de la obesidad. *Rev Endocrinol Nutr.* 2002;10. <http://new.medigraphic.com/cgi-bin/resumenMain.cgi?IDARTICULO=10282>.
6. María J, Valdés B, María ID, et al. Papel de la leptina como señal aferente en la regulación de la homeostasis energética Role of leptin as afferent signal of energy homeostasis regulation. 2016;88(1):74-80.
7. Lecoutre S, Breton C. Maternal nutritional manipulations program adipose tissue dysfunction in offspring. *Front Physiol.* 2015;6:158. doi:10.3389/fphys.2015.00158.
8. Rodríguez-Rodríguez E, López-Plaza B, López-Sobaler AM., Ortega RM. Prevalencia de sobrepeso y obesidad en adultos españoles. *Nutr Hosp.* 26(2):355-363. [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0212-16112011000200017&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112011000200017&lng=es&nrm=iso&tlng=es). Accessed February 18, 2016.
9. González-Jiménez E, Schmidt Río-Valle J. [Regulation of dietary intake and energy balance: factors and mechanisms involved]. *Nutr Hosp.* 27(6):1850-1859. doi:10.3305/nh.2012.27.6.6099.
10. García AP, Palou M, Sánchez J, Priego T, Palou A, Picó C. Moderate caloric restriction during gestation in rats alters adipose tissue sympathetic innervation and later adiposity in offspring. *PLoS One.* 2011;6(2):e17313. doi:10.1371/journal.pone.0017313.
11. Cottrell EC, Ozanne SE. Early life programming of obesity and metabolic disease. *Physiol Behav.* 2008;94(1):17-28. doi:10.1016/j.physbeh.2007.11.017.
12. Dearden L, Ozanne SE. Early life origins of metabolic disease: Developmental programming of hypothalamic pathways controlling energy homeostasis. *Front Neuroendocrinol.* 2015;39:3-16. doi:10.1016/j.yfrne.2015.08.001.
13. 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;3:436. doi:10.3389/fphys.2012.00436.
14. Palou A, Serra F, Bonet ML, Picó C. Obesity: molecular bases of a multifactorial problem. *Eur J Nutr.* 2000;39(4):127-144. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11079733>. Accessed May 11, 2016.
15. William WN, Ceddia RB, Curi R. Leptin controls the fate of fatty acids in isolated rat white adipocytes. *J Endocrinol.* 2002;175(3):735-744. doi:10.1677/joe.0.1750735.
16. Elimam A, Kamel A, Marcus C. In vitro effects of leptin on human adipocyte metabolism. *Horm Res.* 2002;58(2):88-93. doi:10.1159/000064659.
17. Barker DJ. The effect of nutrition of the fetus and neonate on cardiovascular disease in adult life. *Proc Nutr Soc.* 1992;51(2):135-144. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1438321>. Accessed June 25, 2015.
18. Barker DJ, Clark PM. Fetal undernutrition and disease in later life. *Rev Reprod.* 1997;2(2):105-112. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9414472>. Accessed June 9, 2015.
19. Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia.* 1992;35(7):595-601. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1644236>. Accessed October 12, 2015.
20. Konieczna J, García AP, Sánchez J, Palou M, Palou A, Picó C. Oral leptin treatment in suckling rats ameliorates detrimental effects in hypothalamic structure and function caused by maternal caloric restriction during gestation. *PLoS One.* 2013;8(11):e81906. doi:10.1371/journal.pone.0081906.
21. García AP, Palou M, Priego T, Sánchez J, Palou A, Picó C. 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. *Diabetes Obes Metab.* 2010;12(5):403-413. doi:10.1111/j.1463-1326.2009.01174.x.
22. Delahaye F, Breton C, Risold P-Y, et al. Maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons in neonatal male rat pups. *Endocrinology.* 2008;149(2):470-475. doi:10.1210/en.2007-1263.

23. Coupé B, Dutriez-Casteloot I, Breton C, et al. Perinatal undernutrition modifies cell proliferation and brain-derived neurotrophic factor levels during critical time-windows for hypothalamic and hippocampal development in the male rat. *J Neuroendocrinol.* 2009;21(1):40-48. doi:10.1111/j.1365-2826.2008.01806.x.
24. Plagemann A, Harder T, Rake A, Melchior K, Rohde W, Dörner G. Hypothalamic nuclei are malformed in weanling offspring of low protein malnourished rat dams. *J Nutr.* 2000;130(10):2582-2589. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11015493>. Accessed May 25, 2016.
25. Fermín I MY, J Alfredo MH. Epigenética en obesidad y diabetes tipo 2: papel de la nutrición, limitaciones y futuras aplicaciones. *Rev Chil endocrinol diabetes.* 2013;6(3):108-114.
26. Jousse C, Parry L, Lambert-Langlais S, et al. Perinatal undernutrition affects the methylation and expression of the leptin gene in adults: implication for the understanding of metabolic syndrome. *FASEB J.* 2011;25(9):3271-3278. doi:10.1096/fj.11-181792.
27. Coupé B, Amarger V, Grit I, Benani A, Parnet P. Nutritional programming affects hypothalamic organization and early response to leptin. *Endocrinology.* 2010;151(2):702-713. doi:10.1210/en.2009-0893.
28. Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, et al. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(44):17046-17049. doi:10.1073/pnas.0806560105.
29. Raychaudhuri N, Raychaudhuri S, Thamocharan M, Devaskar SU. Histone code modifications repress glucose transporter 4 expression in the intrauterine growth-restricted offspring. *J Biol Chem.* 2008;283(20):13611-13626. doi:10.1074/jbc.M800128200.
30. Palou M, Picó C, McKay JA, et al. Protective effects of leptin during the suckling period against later obesity may be associated with changes in promoter methylation of the hypothalamic pro-opiomelanocortin gene. *Br J Nutr.* 2011;106(5):769-778. doi:10.1017/S0007114511000973.
31. Dulloo AG, Jacquet J, Seydoux J, Montani J-P. The thrifty "catch-up fat" phenotype: its impact on insulin sensitivity during growth trajectories to obesity and metabolic syndrome. *Int J Obes (Lond).* 2006;30 Suppl 4:S23-S35. doi:10.1038/sj.ijo.0803516.
32. Ibáñez L, Ong K, Dunger DB, de Zegher F. Early development of adiposity and insulin resistance after catch-up weight gain in small-for-gestational-age children. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(6):2153-2158. doi:10.1210/jc.2005-2778.
33. Eriksson J, Forsén T, Tuomilehto J, Osmond C, Barker D. Size at birth, fat-free mass and resting metabolic rate in adult life. *Horm Metab Res = Horm und Stoffwechselforsch = Horm métabolisme.* 2002;34(2):72-76. doi:10.1055/s-2002-20518.
34. Kensara OA, Wootton SA, Phillips DI, Patel M, Jackson AA, Elia M. Fetal programming of body composition: relation between birth weight and body composition measured with dual-energy X-ray absorptiometry and anthropometric methods in older Englishmen. *Am J Clin Nutr.* 2005;82(5):980-987. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16280428>. Accessed May 26, 2016.
35. Dulloo AG. Regulation of fat storage via suppressed thermogenesis: a thrifty phenotype that predisposes individuals with catch-up growth to insulin resistance and obesity. *Horm Res.* 2006;65 Suppl 3:90-97. doi:10.1159/000091512.
36. Lillycrop KA, Phillips ES, Jackson AA, Hanson MA, Burdge GC. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. *J Nutr.* 2005;135(6):1382-1386. doi:135/6/1382 [pii].
37. Bai SY, Briggs DI, Vickers MH. Increased systolic blood pressure in rat offspring following a maternal low-protein diet is normalized by maternal dietary choline supplementation. *J Dev Orig Health Dis.* 2012;3(5):342-349. doi:10.1017/S2040174412000256.
38. Bellinger L, Sculley D V, Langley-Evans SC. Exposure to undernutrition in fetal life determines fat distribution, locomotor activity and food intake in ageing rats. *Int J Obes (Lond).* 2006;30(5):729-738. doi:10.1038/sj.ijo.0803205.
39. Vickers MH, Sloboda DM. Strategies for reversing the effects of metabolic disorders induced as a consequence of developmental programming. *Front Physiol.* 2012;3 JUL(July):1-11. doi:10.3389/fphys.2012.00242.
40. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262.
41. Ahmadian M, Suh JM, Hah N, et al. PPAR $\gamma$  signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med.* 2013;19(5):557-566. doi:10.1038/nm.3159.
42. Palou M, Konieczna J, Torrens JM, et al. Impaired insulin and leptin sensitivity in the offspring of moderate caloric-restricted dams during gestation is early programmed. *J Nutr Biochem.* 2012;23(12):1627-1639. doi:10.1016/j.jnutbio.2011.11.005.
43. Bolsoni-Lopes A, Alonso-Vale MIC. Lipolysis and lipases in white adipose tissue - An update. *Arch Endocrinol Metab.* 2015;59(4):335-342. doi:10.1590/2359-3997000000067.