



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

**INFLUENCIA DE FACTORES AMBIENTALES Y
EPIGENÉTICOS EN LA ETAPA EMBRIONARIA SOBRE EL
DESARROLLO DEL SÍNDROME METABÓLICO EN LA
ADULTEZ.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área de Ciencias Biológicas.

Lic. Adriana Laura Burgueño

Director de tesis: Dr. Carlos J. Pirola

Consejera de estudios: Dra. Nora Ceballos

Departamento de Genética y Biología Molecular de Enfermedades Complejas.
Instituto de Investigaciones Médicas.
Universidad de Buenos Aires - CONICET.

Buenos Aires, Noviembre 2008



**INFLUENCIA DE FACTORES AMBIENTALES Y EPIGENÉTICOS
EN LA ETAPA EMBRIONARIA SOBRE EL DESARROLLO DEL
SÍNDROME METABÓLICO EN LA ADULTEZ.**

| Nombre del Jurado | Firma | Calificación |
|-------------------|-------|--------------|
| | | |
| | | |
| | | |

Influencia de factores ambientales y epigenéticos en la etapa embrionaria sobre el desarrollo del síndrome metabólico en la adultez.

El uso de un modelo experimental de restricción del crecimiento intrauterino, mediante la disminución de la ingesta proteica y calórica de las madres (normal y grasa ofrecidas ad-libitum y con 30% de restricción), nos permitió obtener un modelo de peso anormal al nacer en roedores. De este modo, obtuvimos animales de pesos variados, a los que clasificamos según el Z-score en bajo, alto y normo peso. Estos animales mostraron distintas características según el sexo y el peso al nacer, algunas de las cuales se exacerbaron al ingerir dieta grasa, la que permitió desenmascarar características de este modelo. Evaluamos diversos parámetros, como el peso del tejido adiposo, la longitud corporal, los niveles plasmáticos de leptina, insulina, el contenido de TRH en diencéfalo, la presión arterial sistólica y la expresión ciertos genes, como GLP1R, ADIPOR1, ZFP91, THR β . Además del nivel de metilación del promotor de GLP1R y ZFP91. Encontramos resultados muy variados según el sexo y el peso al nacer de los animales. Obtuvimos algunos resultados inesperados, como una falta de relación entre la presión arterial y el contenido de TRH ante la ingesta de dieta grasa, lo que se explicó por la alteración del eje tiroideo. Lo más interesante tal vez sea que la expresión de GLP1R presentó una estrecha relación con el índice HOMA. Los variados resultados obtenidos entre los sexos muestran un importante dimorfismo sexual en respuesta a la ingesta de la dieta grasa dependiendo del desarrollo prenatal.

Palabras clave: síndrome metabólico, obesidad, insulino resistencia, bajo peso al nacer, alto peso al nacer.

Influence of environmental and epigenetic factors in embryonic stage on the development of metabolic syndrome in adulthood.

The use of decreased protein and caloric intake on mothers (normal and high fat diet ad libitum or 30% restricted), enabled us to obtain a rat model of intrauterine growth restriction with abnormal body weight at birth. We classified animals according to the body weight Z-score in low, high and normal weight. Based on their sex and birth weight, animals showed different characteristics, the differences had been exacerbated when they fed high fat diet. We studied in these animals various parameters, such as adipose tissue weight, body length, plasmatic leptin and insulin levels, diencephalic TRH content, systolic blood pressure and expression of genes involved in metabolic regulation such as GLP1R, ADIPOR1, ZFP91 and THR β . In addition, we also studied DNA methylation level of GLP1R and ZFP91 promoters. We found various results according to sex and birth weight of the animals. We obtained some unexpected results, such as the lack of relation of TRH diencephalic content and arterial blood pressure under the high fat diet, which may be explained by the alteration of thyroid axis. The most interesting result was that GLP1R expression presented a close relation with the HOMA index. The varied results obtained between sexes, showed an important dimorphism in response to the intake of high fat diet in a dependent manner of prenatal development.

Key words: metabolic syndrome, obesity, insulin resistance, low birth weight, high birth weight.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecerles a mis padres muy especialmente, por el esfuerzo económico que hicieron durante estos últimos meses.

También a Carlos (el Dr. Pirola) por ayudarme estos meses que han sido muy complicados. Además quiero reconocerle su infinita paciencia hacia esta becaria “descerebrada” (según él) que se olvida de todo, lo que provoca que golpee la puerta de su oficina unas 20 veces al día para comentarle o preguntarle algo (todavía me deja entrar en lugar de tirarme con algo).

A Silvia (la Dra. Sookoian) que soporta los mismos golpes en la puerta y mi vocecita molesta hablando con Carlos. Y que luego de tolerar eso sigue siempre bien predispuesta para evacuar mis dudas y ayudarme en todo lo que necesite.

En particular le quiero agradecerle a Juli que trabajo conmigo desde el principio con los animales de esta tesis y padeció el pesar, marcar y sexarlos, especialmente los fines de semana y los interminables días en que les tomabamos presión a esas ratas malcriadas (por nosotras!). A Noelia, que siempre estuvo dispuesta a darnos una mano cuando la necesitáramos incluso cuando esto implicara quedarse hasta más tarde de lo habitual.

Al resto de los chicos del laboratorio: Mariano, Sole, Caro, Tomás, Sil y Vanesa porque han compartido conmigo durante estos años innumerables y variadas situaciones, además de conversaciones sobre los temas más variados y desopilantes, aliviando las horas de trabajo. A Azu que siempre cooperó con la recolección de rollos de papel higiénico vacíos para malcriar a mis ratitas y a Piti que siempre estuvo dispuesta a responder mis dudas.

Por último, a mis amigos: Ari y Die, los más cercanos y compinches y a Cyn y Lau que intentaron cooperar en la impresión de la tesis.

A todos... los quiero mucho y muchas gracias por su ayuda!!!!

Abreviaturas

- ACV:** accidente cerebro-vascular.
- ADIPOR1:** receptor tipo 1 de adiponectina.
- AGRP:** proteína relacionada a la agouti.
- α -MSH:** hormona alfa melanocito estimulante.
- AP:** alto peso.
- ARC:** núcleo arcuato.
- BP:** bajo peso.
- CRE:** sitio de respuesta a AMPc.
- DG:** Dieta grasa.
- DGR:** Dieta grasa restringida.
- DN:** Dieta normal.
- DNR:** Dieta normal restringida.
- ev:** endovenoso.
- GLP1R:** receptor del péptido similar a glucagon tipo 1.
- HOMA:** índice de insulino resistencia.
- icv:** intracerebroventricular.
- IGF:** factor de crecimiento similar a la insulina.
- IMC:** índice de masa corporal.
- NAFLD:** enfermedad del hígado graso no alcohólico.
- NASH:** esteatohepatitis no alcohólica.
- NP:** normo peso.
- NPY:** neuropéptido Y.
- PAI-1:** inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1.
- PAS:** Presión arterial sistólica.
- PC:** peso corporal.
- PVN:** núcleo paraventricular.
- RAAS:** sistema renina-angiotensina-aldosterona.
- ROS:** especies reactivas del oxígeno.

SHR: ratas espontáneamente hipertensas.

TA: tejido adiposo.

THR β : receptor de hormonas tiroideas tipo beta.

TNF- α : tumor necrosis factor alfa.

TRE: sitio de respuesta a hormonas tiroideas.

TRH: hormona liberadora de tirotrófina.

ZFP91: proteína dedos de zinc 91.

ÍNDICE

| | Página |
|--|--------|
| Resumen en castellano | I |
| Resumen en inglés | II |
| Agradecimientos | III |
| Abreviaturas..... | IV |
| INTRODUCCIÓN: | |
| El síndrome metabólico | 1 |
| Componentes del síndrome metabólico | 3 |
| Hipertensión..... | 3 |
| Obesidad..... | 4 |
| Dislipemias | 7 |
| Hiperglucemia | 7 |
| Hígado graso no alcohólico | 8 |
| La teoría del “origen fetal” de la “programación metabólica” | 10 |
| Modelos experimentales de “programación del desarrollo” | 14 |
| Metilación del genoma | 19 |
| Interacción Leptina- TRH..... | 23 |
| Rol del nivel de leptina al nacer | 27 |
| Hormona liberadora de tirotrófina (TRH) | 28 |
| HIPOTESIS..... | 32 |
| OBJETIVOS | 33 |

MATERIALES Y MÉTODOS:

| | |
|---|------------|
| Diseño experimental | 35 |
| Medida de presión arterial indirecta | 38 |
| Procesamiento de tejidos para cuantificar el contenido de TRH | 39 |
| Cuantificación de TRH por radioinmunoensayo | 40 |
| Determinación del contenido de proteínas | 40 |
| Extracción de RNA total | 41 |
| Evaluación de la expresión génica por “macroarrays” | 42 |
| Retrotranscripción | 46 |
| Extracción de DNA..... | 46 |
| Real Time PCR | 47 |
| Análisis histológico del tejido hepático..... | 52 |
| Determinaciones bioquímicas | 52 |
| Determinación de leptina plasmática | 53 |
| Determinación de insulina plasmática | 53 |
| Cálculo del índice de insulino resistencia (HOMA) | 53 |
| Análisis estadístico | 54 |
| RESULTADOS | 55 |
| DISCUSION | 83 |
| CONCLUSIONES | 102 |
| BIBLIOGRAFIA | 106 |

Introducción



EL SÍNDROME METABÓLICO

En el año 1988, Reaven describió un grupo de anormalidades metabólicas (hipertensión, hipertrigliceridemia, bajos niveles de colesterol HDL e hiperglucemia) asociadas con un incremento del riesgo cardiovascular, al cuál llamó “síndrome X” [1]. Posteriormente denominado “síndrome de insulino resistencia” incluyó además a la obesidad, fundamentalmente central o abdominal. Actualmente, este conjunto de desórdenes metabólicos es llamado Síndrome Metabólico o Cardiometabólico, y se lo define (según el National Health and Nutrition Survey III [2]) como la combinación de 3 o más de los siguientes 5 desórdenes:

- ⇒ Hipertensión arterial
- ⇒ Obesidad central
- ⇒ Hipertrigliceridemia
- ⇒ Bajos niveles de colesterol HDL
- ⇒ Hiperglucemia

En los últimos años se han incluido nuevos criterios diagnósticos de este síndrome, entre los que pueden mencionarse:

- ⇒ índices de inflamación [3]
- ⇒ stress oxidativo [4]
- ⇒ factores protrombóticos [3]
- ⇒ resistencia a la leptina [5]
- ⇒ activación de células endoteliales [6]

⇒ síndrome de ovario poliquístico (incorporado por la asociación americana de endocrinología clínica en 2002 [7])

⇒ hígado graso no alcohólico [8-10]

El síndrome metabólico se encuentra estrechamente relacionado con la alta prevalencia de obesidad, especialmente en los países desarrollados. En Estados Unidos de Norteamérica este síndrome afecta a un 24-34% de la población adulta [11], en los países europeos afecta a más del 36% de la población de entre 40 y 55 años [12]. Su relación con la obesidad es tan notoria que algunas organizaciones consideran que la definición del síndrome esta dada por la presencia de obesidad más dos de alguno de los demás factores mencionados (ver tabla 1).

| | Organización Mundial de la Salud | Programa Nacional de Educación del Colesterol | Federación Internacional de la Diabetes |
|---------------------------------|--|--|--|
| Criterios requeridos | Hiper glucemia/ insulino resistencia más 2 o más de otros 4 criterios | 3 o más de cinco criterios | Obesidad Central más 2 o más de otros 4 criterios |
| Obesidad Central | Relación cintura/cadera > 0,9 (♂), >0,85 (♀) y/o IMC > 30Kg/m ² | Circunferencia de la cintura: Caucásicos: ≥ 102 cm (♂), ≥ 88 cm (♀) Asiáticos: ≥ 90 cm (♂), ≥ 80 cm (♀) Se considera como punto de corte ≥94 cm (♂), ≥ 80 cm (♀) para algunos adultos no asiáticos con fuerte predisposición genética a la insulino resistencia | Circunferencia de la cintura: Europeos, Africanos Sub-Sahara, mediterráneos del este y del este medio (Arabes): ≥ 94 cm (♂), ≥ 80 cm (♀) Sudasiáticos, Chinos y Sud y centro americanos: ≥ 90 cm (♂), ≥ 80 cm (♀) Japoneses: ≥ 85 cm (♂), ≥ 90 cm (♀) |
| Hiper glucemia | Insulino resistencia: diabetes, glucemia alterada en ayunas Intolerancia a la glucosa o uptake de glucosa por debajo del percentilo 25 medido por clamp hiperinsulinémico euglucémico | Niveles de glucosa plasmática en ayunas ≥5,6mmol/L o estar medicado por hiper glucemia | Niveles de glucosa plasmática en ayunas ≥5,6mmol/L o diagnóstico previo de diabetes tipo 2 |
| Dislipidemia | Niveles de triglicéridos ≥1,7 mmol/L y/o Colesterol HDL <0,9 mmol/L (♂), <1,0 mmol/L (♀) | Niveles de triglicéridos ≥1,7 mmol/L o estar recibiendo tratamiento para la hipertrigliceridemia Niveles de Colesterol HDL <1,0 mmol/L (♂), <1,3 mmol/L (♀) o recibir tratamiento para el HDL bajo | Niveles de triglicéridos ≥1,7 mmol/L o estar recibiendo tratamiento para la hipertrigliceridemia Niveles de Colesterol HDL <1,0 mmol/L (♂), <1,3 mmol/L (♀) o recibir tratamiento para el HDL bajo |
| Presión arterial elevada | Presión arterial ≥ 140/90 mmHg | Presión arterial sistólica ≥ 130 mmHg Presión arterial diastólica ≥ 85 mmHg o estar en tratamiento por hipertensión | Presión arterial sistólica ≥ 130 mmHg Presión arterial diastólica ≥ 85 mmHg o estar en tratamiento por hipertensión |
| Otros | Microalbuminuria: Excreción urinaria de albúmina > 20 mg/min o relación albúmina/creatinina > 3,5 mg/mmol | | |

Tabla 1: Definiciones clínicas del Síndrome Metabólico, según distintas organizaciones.

En latinoamérica, alrededor de un 25% de la población adulta padece síndrome metabólico, la prevalencia aumenta con la edad, siendo de un 24% a los 20 años, de un 30% o más en los mayores de 50 años y supera el 40% entre los mayores de 60 años. En nuestro país su prevalencia se encuentra entre un 20 y 25% [13].

Componentes del síndrome metabólico

HIPERTENSION

Se define hipertensión arterial cuando la presión arterial sistólica es superior a 140 mmHg y/o la diastólica superior a 90. Considerándose normal cuando se encuentra por debajo de 120 y 80 mmHg respectivamente, y pre-hipertensión a los valores intermedios entre los antes mencionados [2].

Un mínimo de 65 millones de estadounidenses sufren de hipertensión, lo que incrementa notoriamente el riesgo de un ataque cardíaco o un accidente cerebrovascular (ACV). Aproximadamente un 90-95% de todos los casos de hipertensión arterial constituyen lo que se denomina hipertensión primaria o esencial (cuando la causa es desconocida) mientras que el 5-10% restante sufren de hipertensión secundaria (cuando ésta es causada por otra enfermedad) [14].

A nivel mundial la hipertensión causa el 13% del total de las muertes; es la causante del 62% de los ACV y del 49% de la enfermedad coronaria [15]. En nuestro país es la causante del 17% de las muertes. Estudios recientes han reportado

que la hipertensión arterial presenta alrededor de un 30% de prevalencia en la población (considerando todas las personas con la presión arterial elevada en al menos una consulta, lo que podría ser una sobreestimación) [16].

OBESIDAD

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el sobrepeso como un Índice de Masa Corporal (IMC = peso/altura al cuadrado) ≥ 25 Kg/m², y la obesidad como un IMC ≥ 30 kg/m². Aunque hay pruebas de que el riesgo de padecer enfermedades crónicas (diabetes, hipertensión, etc) aumenta progresivamente a partir de un IMC de 21 kg/m² [16].

Las últimas estadísticas de la OMS indican que en 2005 había en todo el mundo aproximadamente 1600 millones de adultos (mayores de 15 años) con sobrepeso y al menos 400 millones de adultos obesos. Además, esta entidad estima que en el año 2015 habrá aproximadamente 2300 millones de adultos con sobrepeso y más de 700 millones con obesidad [15]

De acuerdo a estadísticas recientes, en Latinoamérica entre un 50 y 60% de los adultos son obesos. En países como México, Argentina [17] y Chile alrededor de un 15% de los adolescentes presentan obesidad y/o sobrepeso. Esto se debe, entre otras razones, a que en la mayoría de los países latinoamericanos, en los últimos años, la población ha experimentado un cambio en la dieta; que implica el descenso en el consumo de frutas y verduras y un incremento del consumo de comida rica en grasas saturadas, azúcares y sal, en paralelo a la disminución en los niveles de

actividad física. Entre un 30 y un 60% de la población no alcanza los niveles mínimos recomendados de actividad física [15].

A nivel nacional se calcula que hay un 34.5% de la población que presenta sobrepeso y un 14.6% obesidad [16].

En el año 2005, año en que se realizó el último relevamiento de la OMS, había en todo el mundo al menos 20 millones de menores de 5 años con sobrepeso [15].

La creciente prevalencia mundial de la obesidad ha llevado a que ésta sea reconocida como uno de los más importantes factores de riesgo para el desarrollo de la hipertensión [18]. De acuerdo a lo publicado en estudios poblacionales, al menos dos tercios de los hipertensos son obesos [19]. La obesidad puede llevar a la hipertensión y a la enfermedad cardiovascular mediante la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) y mediante el incremento de la actividad simpática [20, 21] (ver figura 1).

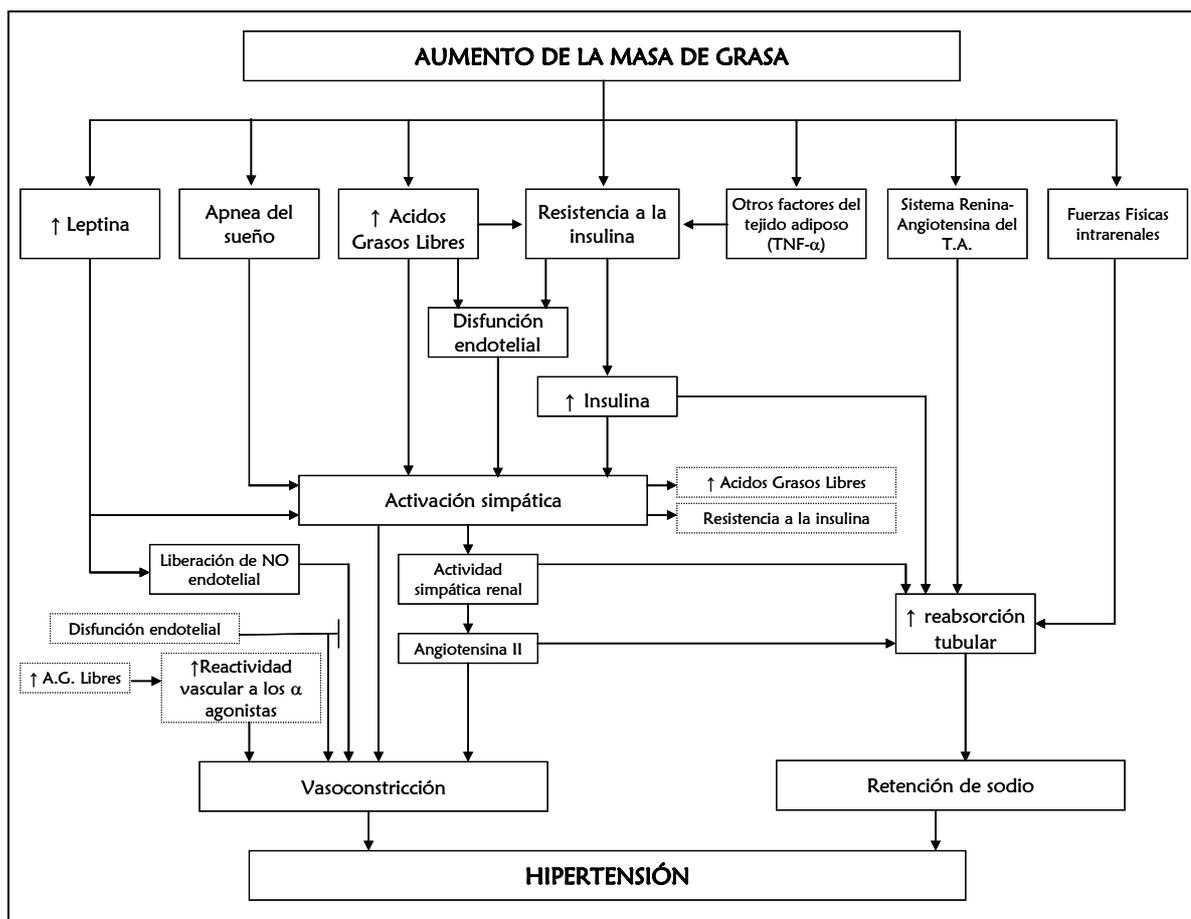


Figura 1: Esquema general de los mecanismos de la hipertensión inducida por obesidad. Algunos factores inducidos o potenciados por la obesidad llevan a la activación simpática, vasoconstricción y retención de sodio, todos estos factores promotores de la hipertensión. AG Ácidos Grasos, NO óxido nítrico [22].

El estudio Framingham y el Tecumseh han demostrado que la ganancia de peso de un hipertenso es significativamente mayor que la de una persona normotensa, lo que sugiere que, incluso una persona hipertensa inicialmente no obesa presenta un mayor riesgo de desarrollar obesidad que un normotenso [23].

DISLIPEMIAS

Hipertrigliceridemia

Los triglicéridos al igual que el colesterol, son transportados a las células del organismo por las lipoproteínas de la sangre. Los niveles elevados de triglicéridos aumentan el riesgo cardiovascular [14]. El valor de corte de los triglicéridos en suero es ≥ 150 mg/dl (1.7 mmol/L) indistintamente del sexo [2].

Bajos niveles de colesterol HDL

Las partículas de HDL transportan el colesterol de las células hacia el hígado, donde puede ser eliminado del organismo. El colesterol HDL es considerado “benigno” ya que los niveles elevados reducen el riesgo cardiovascular. Las personas con niveles bajos de HDL tienen un mayor riesgo cardiovascular, a menudo esto es una consecuencia de la inactividad física, la obesidad o el hábito de fumar. También es común entre las personas que padecen de diabetes tipo 2. Los valores tomados como corte para considerar si el HDL se encuentra bajo son: hombre ≤ 40 mg/dl (1.0 mmol/L); mujer ≤ 50 mg/dl (1.3 mmol/L).

HIPERGLUCEMIA

Consiste en la presencia de elevados niveles de glucosa en sangre debido a que el organismo se torna resistente a la insulina, por lo que la hormona no ejerce su efecto hipoglucemiante. La hiperglucemia forma parte de los criterios diagnósticos de la diabetes tipo II. Este tipo de diabetes se presenta generalmente en la edad adulta. Los individuos que presentan niveles de glucosa plasmática en ayunas ≥ 100

mg/dl (5.5 mmol/L) se consideran hiperglucémicos y ≥ 110 mg/dl diabéticos (5.6 mmol/L).

HIGADO GRASO NO ALCOHÓLICO

El hígado graso de etiología no alcohólica (o esteatosis hepática, NAFLD de sus siglas en inglés) fue puesto en evidencia por primera vez por Ludwig y colaboradores en 1980 [24].

La esteatosis hepática se caracteriza por la acumulación de ácidos grasos en el citoplasma de los hepatocitos como consecuencia de un anormal metabolismo de éstos por parte del hígado. Los mecanismos que podrían desencadenar este proceso son:

- ⇒ un aumento excesivo de ácidos grasos transportados hacia el hígado en relación a la cantidad que pueden ser metabolizados,
- ⇒ un incremento de la síntesis mitocondrial de ácidos grasos, o
- ⇒ una falla en la síntesis o secreción de apolipoproteínas y/o triglicéridos.

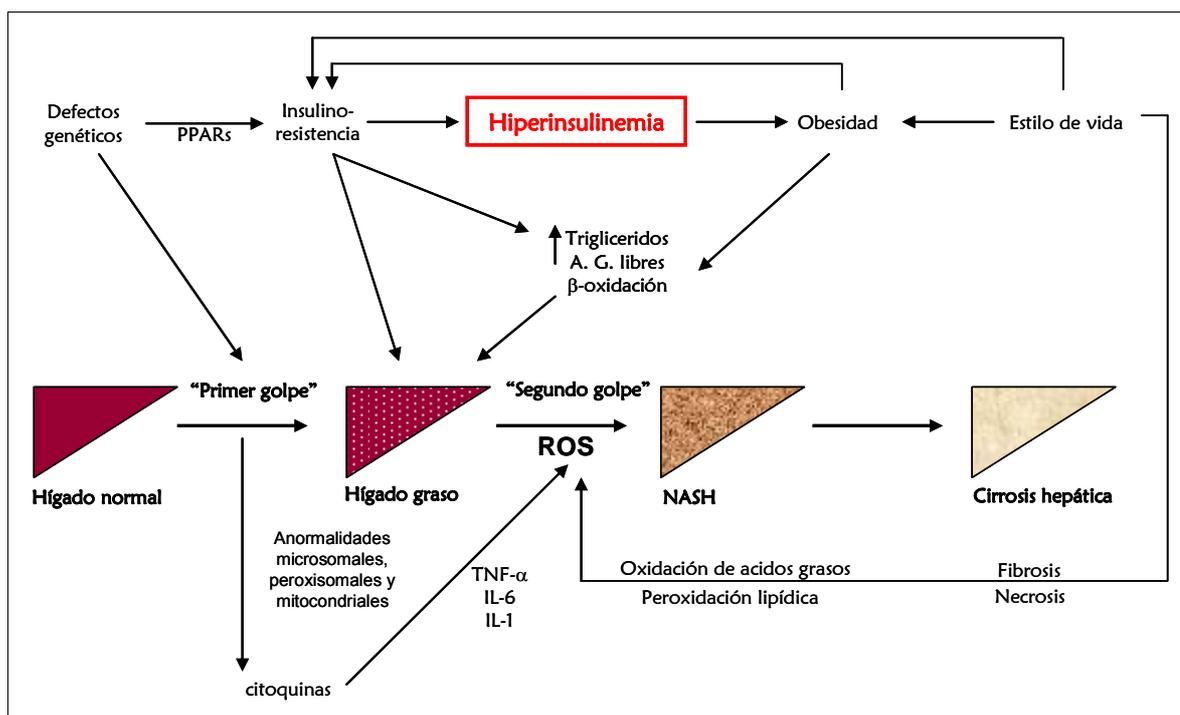


Figura 2: Inicio y progresión del hígado graso hacia NASH y cirrosis. Ilustración de la teoría de los dos golpes: la esteatosis hepática es el insulto inicial (primer evento); una vez que el hígado ha desarrollado esteatosis se vuelve más vulnerable a otros insultos (segundo evento) lo que produce un incremento en el stress oxidativo lo que eventualmente progresa hacia la muerte celular y la inflamación [25].

El mecanismo exacto de progresión de la enfermedad desde una esteatosis simple hacia la forma clínica más severa, denominada esteatohepatitis o NASH en su sigla en inglés (la cual se presenta con inflamación y/o fibrosis hepática) no es claro, la teoría más aceptada es la denominada de los dos eventos (ver figura 2): el “primer evento” consiste en el desarrollo de la esteatosis, esto provoca que el hígado sea más vulnerable a otros insultos, entre ellos el stress oxidativo y la disminución de los antioxidantes (“segundo evento”) que pueden llevar al desarrollo de NASH y si la enfermedad progresa hacia estadios más graves se desarrollará cirrosis [26].

El aumento de la oxidación de los ácidos grasos hepáticos puede llevar a la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) lo que promueve la disfunción mitocondrial, la peroxidación lipídica y/o la secreción de citoquinas.

Actualmente se estima que un 30% de la población adulta de los Estados Unidos presenta NASH. Esta enfermedad tiene una prevalencia de aproximadamente un 16 - 20% entre individuos no obesos y 76-100% entre los obesos. Además, se ha demostrado que está fuertemente asociada con la reducción en la sensibilidad a la insulina (resistencia a la insulina) y aumento de la tasa de gluconeogénesis, entre otros [27, 28].

La relación entre el hígado graso no alcohólico y el síndrome metabólico es cada vez más reconocida, aproximadamente el 90% de los pacientes con NASH tienen al menos una característica del síndrome metabólico, y alrededor de un 33% tienen síndrome metabólico, lo que hace que el NASH sea la representación hepática del síndrome metabólico [10].

La teoría del “origen fetal” de la “programación metabólica”

Barker y colaboradores [29, 30] postularon una teoría denominada de “origen fetal” en la que proponen, basados en evidencia epidemiológica, que un medio ambiente pobre en el útero (causado por ejemplo por la mala alimentación materna o por una insuficiencia placentaria) puede “programar” cierta susceptibilidad en el feto (provocando un crecimiento anormal) que lo lleve al

desarrollo de enfermedades cardiovasculares y metabólicas en la adultez. Actualmente, esta “programación” se considera que puede ser cualquier situación donde hay un estímulo o un insulto durante el desarrollo fetal que produce una respuesta fisiológica permanente [31].

La hipótesis del “fenotipo ahorrativo” (figura 3) propuesta por Hales & Barker [32] intenta explicar la asociación entre el bajo peso al nacer y el desarrollo de diabetes tipo 2 en el adulto. Postula que, si la nutrición en el útero es pobre, habrá respuestas adaptativas en el feto tendientes a maximizar la incorporación y conservación de los nutrientes disponibles, lo que resulta en un metabolismo conservativo. Si el infante, luego, se ve expuesto a una dieta deficiente similar a la experimentada en el útero, el “fenotipo ahorrativo” adquirido le permitirá soportar estas condiciones. Sin embargo, el problema de salud se hará evidente cuando la dieta postnatal sea plena o no concuerde con la experimentada en el útero materno, como consecuencia de esto el individuo desarrollará síndrome metabólico.

Generalizando, se considera que la enfermedad se manifestará cuando la nutrición postnatal sea mejor que la predicha en el útero [34].

Como predice esta hipótesis, se ha observado mediante estudios epidemiológicos, que el peso al nacer está relacionado con el desarrollo en la adultez de:

- ⇒ hipertensión [35],
- ⇒ insulino resistencia [36],
- ⇒ disfunción vascular [37] y

⇒ dislipidemia [29].

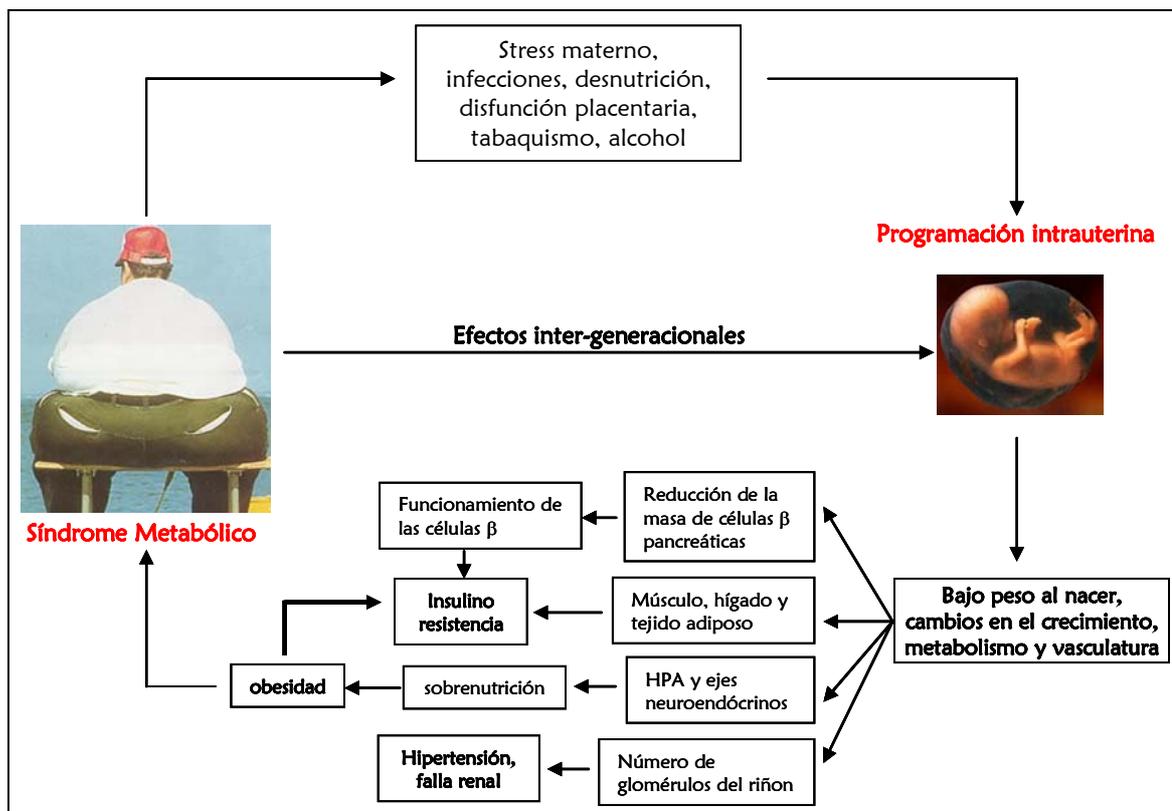


Figura 3: Representación esquemática de la hipótesis del “fenotipo ahorrativo”, ilustrando los efectos de la programación de un medio uterino subóptimo, y el subsecuente desarrollo del síndrome metabólico [33].

La gran importancia de la nutrición materna y su influencia sobre el peso al nacer y la subsecuente enfermedad durante la vida adulta ha sido ampliamente demostrada en estudios realizados en Holanda con individuos expuestos a la hambruna (durante la segunda guerra mundial) [29]. Numerosos estudios poblacionales han identificado que el riesgo cardiovascular es mayor cuando los individuos sufrieron una pobre nutrición intrauterina.

En algunos de estos estudios no se halló relación entre la nutrición intrauterina y las enfermedades del adulto, pero en todos los casos, esto puede

explicarse debido a que durante el crecimiento los individuos recibieron una alimentación pobre, similar a la disponible durante su gestación [38].

Otros estudios sugieren que el mayor riesgo de presentar enfermedades asociadas a la mala nutrición intrauterina ocurre cuando un individuo presenta bajo peso al nacer y crece rápidamente durante los primeros meses de vida alcanzando el tamaño esperado si hubiera nacido con un peso normal [38].

Por otro lado, el consumo de dietas ricas en grasa puede provocar que aumente el riesgo de padecer diabetes gestacional y pre-eclampsia [39]. Cada vez existe más evidencia, en su mayoría procedente de estudios con animales, que sugiere que el feto puede desarrollar enfermedad cardiovascular en la adultez si fue expuesto a sobrenutrición durante la gestación [40]. Un estudio de cohorte Escocés muestra que niños cuyas madres consumieron una dieta rica en carbohidratos presentaron presión arterial elevada y una perturbación en la homeostasis de la glucosa en la edad adulta [41, 42]. En animales, hembras preñadas expuestas a una dieta rica en carbohidratos reducen su consumo de alimento de modo de mantener una ingesta calórica constante [43]. Debido a esto, es de esperar que el fenotipo de las crías procedentes de animales sometidos a una dieta rica en grasa esté determinado por la exposición a este tipo de dieta, más que por una diferente ingesta calórica por parte de la madre [44].

Modelos experimentales de “programación del desarrollo”

Los animales de laboratorio están siendo extensamente utilizados en modelos de programación del desarrollo como consecuencia de su corta vida y de la posibilidad de controlar las influencias genéticas. Muchos de los resultados obtenidos han demostrado la gran similitud entre las enfermedades que desarrollan los animales y las que componen el síndrome metabólico humano [44].

Se ha descrito en la bibliografía una amplia gama de estrategias utilizadas de restricción del crecimiento intrauterino, las más difundidas son las que implican una manipulación de la dieta materna [44]. Entre las que se encuentran descritas diversas opciones:

- ⇒ restricción calórica global,
- ⇒ reducción del contenido proteico de la dieta,
- ⇒ restricción del contenido de hierro,
- ⇒ suplementación con dieta grasa, entre otras.

Los modelos más difundidos son aquellos en los que la hembra preñada es sometida a una malnutrición, aunque debe tenerse en cuenta que la limitación fundamental de este modelo se encuentra en las diferencias en el desarrollo de la rata y el humano. Básicamente, la rata es un animal altricial, esto significa que, a diferencia del hombre (que es precocial), nace con el sistema nervioso y autocrino inmaduro y su maduración ocurre durante la lactancia. Como se describirá más adelante esta diferencia es esencial en la maduración de los circuitos neuronales que regulan el apetito [45, 46].

La gran mayoría de los resultados obtenidos al utilizar las estrategias antes mencionadas para la “programación del desarrollo” son dependientes de los procedimientos utilizados para lograr la restricción del crecimiento intrauterino. Al intentar reproducir lo observado en el hombre, la principal crítica a los métodos descritos es que se basan en la administración de una dieta con bajo contenido en proteínas, y esto no refleja lo que sucede en el hombre, en el que la malnutrición consiste, en la mayoría de los casos, en una menor ingesta calórica (como lo sucedido en la Segunda Guerra Mundial en Holanda) [47-49]. Por este motivo lo correcto para reproducir lo que sucede en el hombre sería restringir la ingesta diaria de los animales.

A pesar de la gran variabilidad entre los protocolos de restricción alimentaria utilizados, en casi todos se expone a las crías a una lactancia con la madre bajo una dieta normal y se las mantiene así hasta su estudio en la edad adulta. En muy pocos casos la restricción calórica se extiende hasta el destete de los animales [44].

Hay discordancia en cuanto a la cepa de animales utilizada, las más frecuentes son las Wistar y las Sprague Dawley [44]. También hay descritas diversas opciones en cuanto a partir de que día se comienza la restricción dietaria (en algunos casos es desde dos semanas antes de la gestación). Otro punto en el que hay variabilidad es en qué grado de restricción dietaria se utiliza (algunos trabajos utilizan un 30% [50] mientras que otros restringen hasta un 70% [51] del consumo normal del animal).

La ingesta materna de una dieta rica en grasas o en colesterol durante la gestación y lactancia, en los roedores, resulta en un fenotipo similar al síndrome metabólico humano [44], se ha descrito que esto provoca:

- ⇒ homeostasis anormal de la glucosa [52, 53],
- ⇒ aumento de la presión arterial [43, 54],
- ⇒ perfil lipídico anormal [52, 54],
- ⇒ incremento de la adiposidad [52, 55],
- ⇒ presencia de lesiones pro-aterogénicas [56],
- ⇒ reducción de la vasodilatación inducida por acetilcolina [55, 57, 58] e
- ⇒ hiperleptinemia [53].

Estudios de expresión de genes realizados por “microarray” en aorta han revelado diversas alteraciones entre los animales procedentes de madres sometidas a una dieta rica en grasas, por ejemplo: alteración de la expresión de los genes que codifican para el colágeno y la elastina, la enzima óxido nítrico sintetasa endotelial e inducible y reducción del número de mitocondrias. [53].

La hiperinsulinemia e hiperglucemia encontradas en estos animales se encuentran acompañadas de una reducción de la sensibilidad a la insulina en diversos tejidos, cambios ultraestructurales del páncreas y una deficiente secreción de insulina [53], lo que sugiere que el agotamiento de las células de los islotes pancreáticos es debido a una mayor demanda de insulina, secundaria a la adquisición de insensibilidad a la insulina por parte del músculo esquelético. Los cambios en la presión arterial de las crías hembras de estas madres parece ser debida a una alteración en la sensibilidad de los barorreceptores y no a disfunción endotelial [54]. Estos animales no mostraron signos de presentar hiperfagia ni reducción de la actividad locomotora [54], por lo que se ha propuesto que el

incremento del peso corporal y de la adiposidad deben ser consecuencia de una reducción en la actividad metabólica basal, hipótesis compatible con la reducción del número de copias de las mitocondrias antes mencionado [40].

Hasta el momento no está muy estudiado si existe alteración de la neuroanatomía o de la neuroquímica en el desarrollo del fenotipo del síndrome metabólico en animales, sin embargo hay evidencia que indica que el aumento de la insulina y de los factores relacionados (como el factor de crecimiento similar a insulina: IGF) es crucial para la diferenciación neuronal y la formación y consolidación de las sinapsis en el hipotálamo [59]. Además, Levin y colaboradores han propuesto que el incremento de la insulina o del neuropéptido Y actuando sobre el núcleo arcuato del hipotálamo (ARC), podría resultar en el “imprinting” metabólico de circuitos neuronales en la edad temprana, y de este modo elevar el “set point” del circuito del apetito, provocando un incremento en el peso corporal, y de esta forma provocando la obesidad en las crías [60]. Este mismo grupo ha encontrado una reducción de la densidad de neuronas noradrenérgicas en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) de ratas obesas procedentes de madres también obesas [60]. Otros autores sugieren que la alteración de la actividad metabólica basal, más que los cambios en la regulación central del apetito, son los que ocurren en estas crías [53, 54]. Sin embargo, hay evidencia que sostiene un rol para la alteración de la función del sistema nervioso central y la concentración de insulina hipotalámica en ratas neonatas que al crecer muestran un fenotipo similar al síndrome metabólico [59]. A modo de resumen, en la figura 4 se muestran algunos de los efectos descritos de la mala nutrición materna sobre las crías.

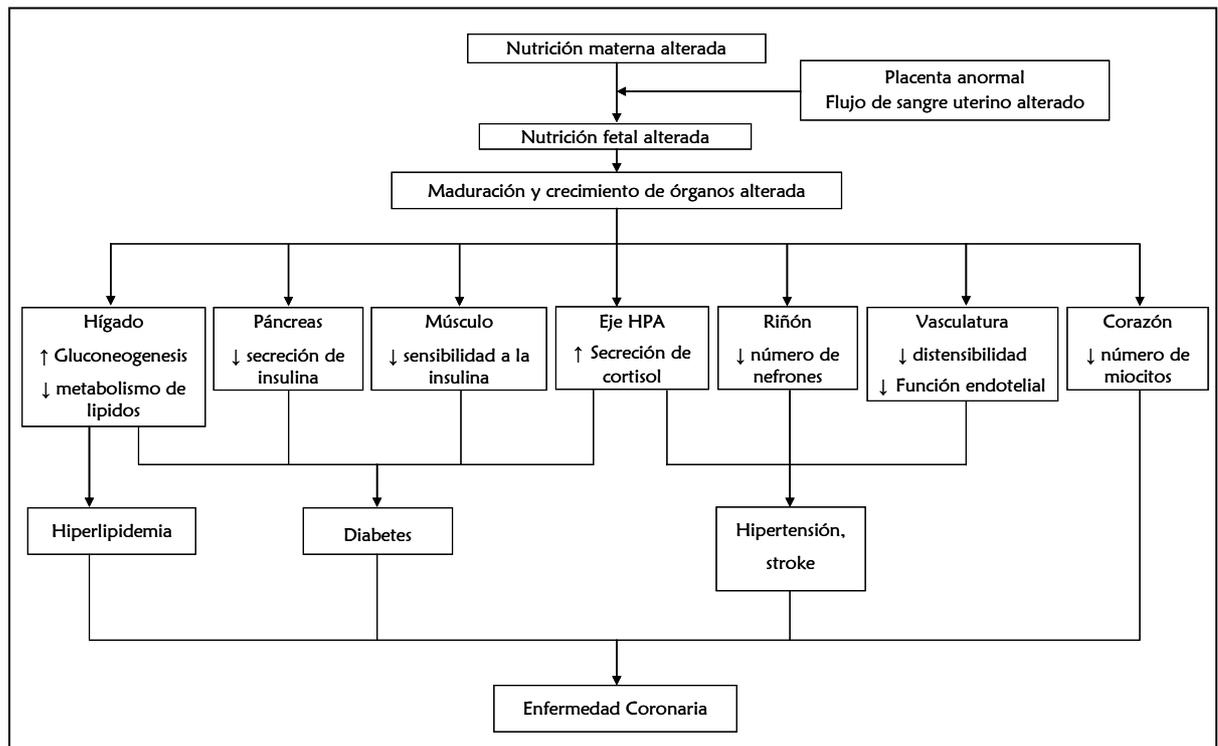


Figura 4: Efectos descriptos de la mala nutrición fetal sobre el crecimiento y la maduración del feto y su relación con enfermedades en el adulto [61].

METILACIÓN DEL GENOMA

El término epigenética, acuñado por Conrad Hal Waddington, es utilizado para referirse a los factores que gobiernan los patrones estables de expresión génica, usualmente transgeneracionales, que ocurren sin cambios en la secuencia del DNA. La regulación epigenética juega un importante rol en el desarrollo de animales y plantas, y es necesaria para lograr la expresión o represión estables de genes de un tipo celular específico o de un estadio del desarrollo específico. Hay muchas modificaciones epigenéticas covalentes involucradas en mantener genes activos o reprimidos en forma estable (como se ilustra en la figura 5) [62].

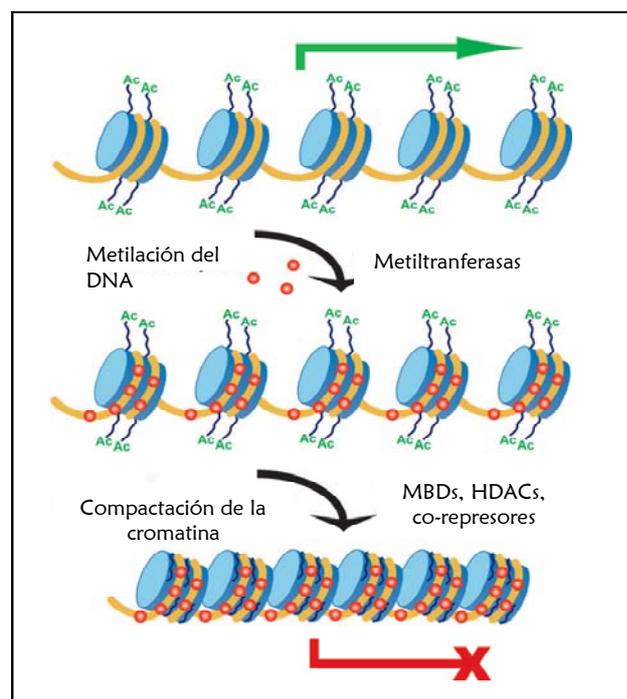


Figura 5: Transformación de una región transcripcionalmente activa en cromatina compacta e inactiva. La metilación del genoma por las metiltransferasas permite el reclutamiento de proteínas con dominios de unión a grupos metilo (MBD) los cuales luego reclutan deacetilasas de histonas (HDACs, co-represores transcripcionales y otras enzimas que modifican la cromatina)[63].

Posiblemente, la modificación epigenética más estudiada sea la metilación del DNA. En el genoma de los mamíferos esta modificación ocurre en citosinas que se encuentran seguidas por una guanina (CpG). En la mayoría de los casos la adquisición y mantenimiento de estas secuencias de CpG metiladas inducen a la represión génica [62].

Generalmente, el grado de metilación en el extremo 5' de un gen está inversamente relacionado con su nivel de expresión; sin embargo la metilación en sitios específicos del extremo 3' y dentro de un gen también han sido asociados con un aumento de la actividad del mismo [64]. Por ejemplo, en el hombre la expresión del gen glucosa 6-fosfato deshidrogenasa se encuentra correlacionada con el nivel de metilación de sitios específicos en el extremo 3' del gen [65]. En la rata, el gen de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa esta desmetilado en el hígado y riñón del animal adulto (sitios de expresión de la enzima) comparado con los tejidos donde no se expresa la enzima [66]. El patrón tejido específico de metilación del DNA puede surgir por diferentes vías. Tanto el ovocito como el espermatozoide están hipometilados con respecto a las células somáticas. La metilación *de novo* de todo el genoma ocurre tempranamente en la embriogénesis [67]. Al diferenciarse las células, ocurre la desmetilación tejido específica de genes, lo que se correlaciona con su expresión en los tejidos apropiados y que lleva a una metilación en mosaico en el adulto. En algunas instancias, la desmetilación parece preceder a la expresión génica. Mientras que, en otros casos, se observan genes que se expresan venciendo la metilación y su desmetilación ocurre luego del inicio de su expresión [68]. La mayoría de la evidencia que sugiere el importante rol de la metilación del DNA en el desarrollo y la diferenciación celular es por correlación, pero no dilucida si la

actividad génica causa la desmetilación o si es a la inversa. Los ratones “knock out” para la actividad de la DNA metilasa mueren en forma temprana en la gestación, lo que indica que la metilación del DNA es crítica para el desarrollo de los mamíferos [69]. Dado que la nutrición temprana afecta la expresión génica durante la diferenciación, la metilación del DNA puede estar involucrada en este fenómeno, lo que provocaría un efecto persistente sobre la actividad génica [70].

También debe tenerse en cuenta que hay casos donde la metilación de un gen permite la expresión de un gen vecino. Además, la expresión génica es también determinada por la organización de las histonas en los nucleosomas, sobre las que también pueden ocurrir diversas modificaciones covalentes que pueden provocar la modificación de la expresión génica [62].

Es importante destacar que las modificaciones epigenéticas en el DNA y la cromatina constituyen el nexo entre el genotipo y el fenotipo. Esto es debido a que no basta con poseer una determinada información en los genes, sino que ésta debe poder manifestarse. Factores ambientales y nutricionales pueden influir sobre el mantenimiento de las modificaciones epigenéticas durante toda la vida [71].

Recientemente, utilizando ratones agouti (que sobreexpresan la proteína relacionada a la agouti, y que, como consecuencia, presentan pelaje amarillento, hiperfagia, hipertensión y obesidad) se ha demostrado claramente como los nutrientes influyen sobre la epigenética. Los mismos, fueron sometidos a una dieta rica en folatos, vitamina B12, colina y betaína, que incrementan el metabolismo de los donantes de grupos metilo (*S*-adenosilmetionina) en la célula. Este tratamiento provocó claros cambios en el fenotipo, relacionados con un aumento de la

metilación del DNA en el locus del gen A^{vy} (gen responsable de las características del ratón antes mencionado) con su consecuente inactivación lo que resultó en animales con un fenotipo normal [72].

INTERACCIÓN LEPTINA – TRH

La **leptina**, producto del gen *ob* fue descubierta en 1994 [73]. La fuente principal de la leptina es el tejido adiposo, tanto el blanco como el marrón, pero también es producida en otros tejidos, incluyendo la placenta [74].

Esta hormona, de 167 aminoácidos, juega un rol esencial en:

- ⇒ la homeostasis energética,
- ⇒ la regulación de la ingesta de alimento y
- ⇒ la composición corporal.

Comienza su acción muy tempranamente en la vida del individuo, ya que controla todo el crecimiento fetal y su desarrollo [74].

Ejerce su acción por diversos medios (ver figura 6):

- ⇒ inhibe la secreción del neuropéptido Y (NPY) en el núcleo arcuato;
- ⇒ actúa sobre el hipotálamo ventromedial provocando un aumento de la producción de la hormona alfa melanocito estimulante (α -MSH),
- ⇒ disminuye la producción de la proteína relacionada a la agouti (AGRP), un antagonista de la α -MSH que actúa sobre los receptores tipo 4 de esta hormona (MC-4R) [75].

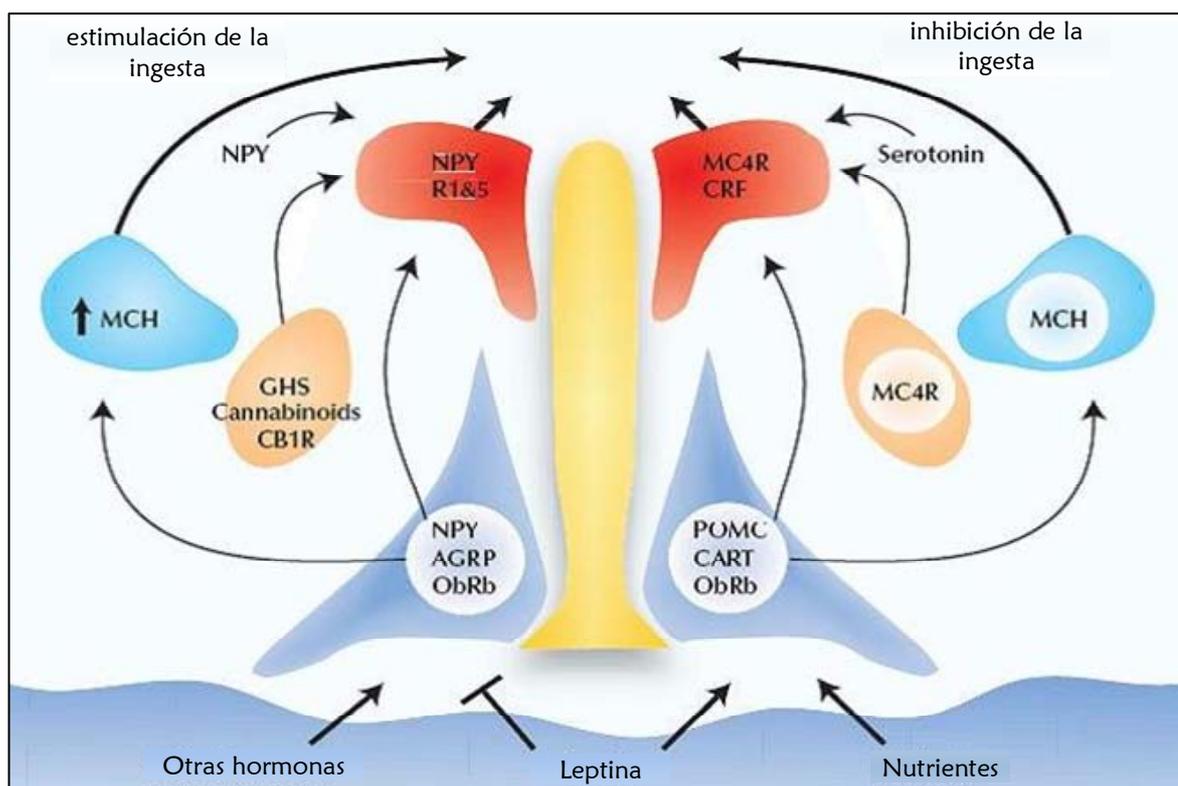


Figura 6: El circuito neuronal que regula la ingesta de alimento y el peso corporal. La leptina modula la actividad de los circuitos neuronales en el hipotálamo y en otras regiones cerebrales. En el hipotálamo, la leptina inhibe neuronas que estimulan la ingesta (expresan NPY, AGRP) y estimula neuronas que reducen la ingesta (que expresan POMC). Los endocannabinoides y los neurotransmisores clásicos (como la serotonina) también componen este circuito neuronal. CART: transcrita regulada por anfetaminas, CB1R: receptor tipo 1 de cannabinoides, CRF: factor liberador de corticotrofina, GHS: receptor de grelina. [76]

Además, actúa sobre el sistema nervioso central ejerciendo acciones neurotróficas de control de la alimentación durante el período de desarrollo del hipotálamo [77]. Debe tenerse en cuenta que, en la rata, las proyecciones neuronales hipotalámicas se desarrollan durante las dos primeras semanas de vida [78]. Este período postnatal es también crítico para la programación del apetito y del contenido de masa grasa del cuerpo. La sobrenutrición durante este período induce alteraciones permanentes en las neuronas hipotalámicas que expresan los neuropéptidos que regulan el apetito, lo que lleva a hiperfagia y obesidad [79]. También se ha demostrado que la exposición a la leptina durante el período

neonatal altera el desarrollo de las conexiones neuronales entre el núcleo arcuato y los otros núcleos hipotalámicos intermediarios en la regulación de la ingesta (el núcleo paraventricular, el hipotálamo dorsomedial y el área lateral del hipotálamo) [45]. La deficiencia en leptina tiene efectos específicos sobre el desarrollo de las proyecciones del núcleo arcuato. Además, la leptina ejerce su acción promoviendo la elongación y proliferación de los axones de las neuronas del núcleo arcuato [45].

A diferencia de las ratas, en las especies precociales como el hombre, el desarrollo de los circuitos neuronales ocurre antes del nacimiento [80]. Existen estudios que demuestran que al contrario de lo que sucede en el adulto, durante la vida intrauterina y un corto período posterior al nacimiento, la leptina no inhibe el apetito, sino que promueve la deglución y la hiperfagia, contribuyendo al rápido crecimiento y ganancia de peso del recién nacido, aunque esta evidencia aún no es concluyente [81, 82]. Por lo tanto, factores que puedan influir sobre los niveles de leptina del feto podrían alterar la programación de conducta del apetito modificando los “set point” normales, como también el metabolismo energético y la adiposidad [45, 81, 83]. Sin embargo, es importante destacar que tanto los neonatos que presentan altos como los que presentan bajos niveles de leptina al nacimiento tienen mayor riesgo de desarrollar obesidad y diabetes tipo 2 comparados con niños que presentan niveles normales de leptina al nacer [84-87]. Además, debido a las acciones de la leptina sobre el aparato reproductivo, un medio ambiente intrauterino adverso que modifique los niveles de leptina, podría perturbar el sistema reproductivo e incrementar el riesgo de padecer cáncer de mama durante la vida adulta [88, 89].

A nivel periférico, la leptina estimula el proceso de oxidación de los ácidos grasos en el músculo, inhibe la acumulación de triglicéridos en las células hepáticas [90] y posee un potente efecto de disminución de los lípidos en los tejidos periféricos y el plasma, lo que es esencial para la prevención de la lipotoxicidad celular y la insulino resistencia [91].

En cuanto al crecimiento uterino, su efecto parece ser independiente de la insulina y del sistema de la hormona de crecimiento e IGF-1 [74].

Por otra parte, la leptina parece ser el nexo entre el estado nutricional y la maduración reproductiva, interfiriendo con la regulación de la adeno- y neurohipófisis [90, 92-94]. Más aún, se ha observado que la leptina tiene una secreción pulsátil, sincronizada con la hormona luteinizante y el estradiol [94], así un nivel normal de leptina es un importante prerrequisito para determinar el inicio de la pubertad y el mantenimiento de los ciclos menstruales y la función reproductiva normal [95-99].

Además la leptina tiene otros efectos metabólicos, entre los que pueden mencionarse:

- ⇒ inhibición de respuestas al stress [100-102],
- ⇒ disminución de la resorción ósea y estimulación de la diferenciación a osteoblastos [103],
- ⇒ promueve la hematopoyesis y la linfopoyesis [104-106],
- ⇒ esta implicada en la maduración de la mucosa intestinal [107] y
- ⇒ contribuye al desarrollo pulmonar en el útero [108, 109].

⇒ influye sobre el control cardiovascular.

Se han encontrado receptores de leptina en zonas del cerebro que son importantes en la regulación de la función cardiovascular. La administración de leptina en forma intracerebroventricular (icv) induce un efecto presor y simpatoexcitatorio por vía central [110], mientras que su administración endovenosa (ev) modula la función cardiovascular por medio de los nervios simpáticos centrales y/o el sistema de óxido nítrico periférico [111].

Rol del nivel de leptina al nacer

Hay cada vez más evidencia de que existe una fuerte correlación entre el nivel de leptina y el peso al nacer del neonato. Esto puede ser un reflejo de la contribución de la masa de grasa corporal o de la masa placentaria a los niveles de leptina [112-119]. Así, en la restricción del crecimiento intrauterino, los recién nacidos a término presentan menores niveles de leptina en la sangre del cordón umbilical que los apropiados para su edad gestacional [120-124]. Más adelante en su vida, estos niños presentarán mayores niveles de leptina en suero que los chicos con un peso normal al nacer, lo que podría indicar una respuesta de resistencia a la leptina, la cual es beneficiosa para permitir al niño alcanzar el peso normal durante el crecimiento [121]. Además los niños que nacen con un peso mayor a lo normal para su edad gestacional presentan altos niveles de leptina al nacer, lo que correlaciona positivamente con los niveles de insulina del cordón umbilical [84, 124-

128].

Hay estudios que indican que la concentración de ácidos grasos en el cordón umbilical parece determinar los niveles de leptina en la adultez [129].

Tanto los niños que nacen con bajo peso como los de alto peso tienen incrementado el riesgo de desarrollar obesidad, diabetes mellitus e hipertensión durante la adultez. Como se mencionó anteriormente, los niveles de leptina de estos niños se encuentran alterados [130-132].

Los últimos datos de la Organización Mundial de la Salud indican que en nuestro país un 7% de los niños nacidos entre 2000 y 2002 presentaron bajo peso al nacer [15].

Hormona liberadora de tirotrófina (TRH)

La **TRH** es un neuropéptido que efectúa algunas de sus acciones como una hormona. Es un tripéptido, que es sintetizado como una prehormona. La misma presenta 5 copias del tripéptido. El promotor del gen que la codifica presenta sitios de respuesta a AMPc (CRE), sitios negativos de respuesta a hormonas tiroideas (TREs) y elementos de respuesta presentes en genes inducidos por catecolaminas y glucocorticoides, además tiene un “enhancer” tejido específico que responde a insulina [133, 134].

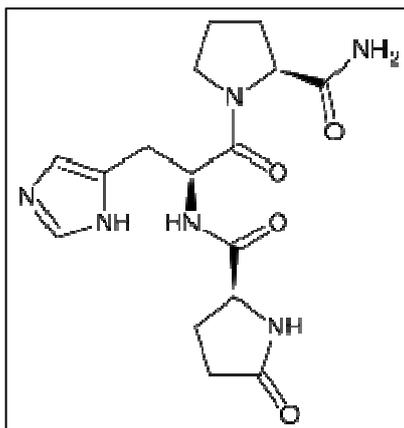


Figura 7: Estructura de la hormona liberadora de tirotrófina

Se han encontrado neuronas que expresan TRH en el hipotálamo (en el núcleo paraventricular (PVN), núcleo dorsomedial, hipotálamo lateral, área preóptica y en el núcleo periventricular) y en regiones extrahipotalámicas (diencéfalo, telencéfalo, mesencéfalo y en la médula espinal), estas últimas no inervan la eminencia media ni están reguladas como las neuronas tirotróficas del PVN [135].

La presencia de TRH en áreas del cerebro involucradas en la regulación cardiovascular, como por ejemplo el área preóptica (crucial en la regulación de la presión arterial, la liberación de la hormona antidiurética, la natremia y del volumen de sangre) sugiere que este neurotransmisor ejerce su acción sobre al menos, alguna de estas funciones fisiológicas.

Trabajos previos de nuestro laboratorio, sugieren un rol neuromodulador de la TRH en la neurotransmisión colinérgica, efecto aparentemente mediado por un incremento en el número de receptores muscarínicos de la región septo-lateral del cerebro [136]. Por otra parte, los efectos cardiovasculares centrales de la TRH

parecen estar mediados principalmente por la activación simpática, ya que si se trata con un bloqueante alfa 1 adrenérgico, se anula la respuesta presora de la TRH [136]. Existe una gran cantidad de evidencia que indica que el efecto de la TRH en la activación simpática está mediado por varios sistemas clásicos de neurotransmisores, como el muscarínico, el catecolaminérgico y serotoninérgico [137-139]. Además la TRH se encuentra colocalizada con otros neurotransmisores y/o neuromoduladores incluyendo serotonina, sustancia P, dopamina y neuropéptido Y [140, 141].

En las ratas espontáneamente hipertensas (SHR) se ha encontrado el doble de contenido de TRH en el área preóptica que en sus controles (Wistar Kyoto), probablemente debido a un aumento de la síntesis de TRH, entre las muchas anomalías neuroquímicas que se observan en estos animales [142].

En nuestro laboratorio además, se ha demostrado que la leptina se encuentra disminuída en la hipertensión inducida por TRH. La infusión icv de un plásmido de expresión eucariota con la secuencia del gen de TRH, provocó una disminución en los niveles plasmáticos de leptina y un aumento en la presión arterial, fenómeno que no se observó cuando se administró la secuencia antisense del gen. Esta disminución de los niveles de leptina circulante puede provocar una ganancia compensatoria de tejido adiposo, llevando a que el animal se torne obeso provocando así un aumento de la leptina y de la TRH perpetuando un ciclo vicioso. [110], lo que explicaría que la asociación entre hipertensión y obesidad sea de doble sentido [23].

A su vez, la acción de la leptina sobre la expresión del gen de TRH puede estar mediada por un aumento de la hormona alfa melanocito estimulante (α -MSH) o por una disminución del neuropéptido Y (NPY) [143, 144]. Se ha observado que

en ayunas hay una disminución de los niveles del mensajero de TRH hipotalámica y que esto puede ser prevenido mediante la administración de leptina. Algunos autores han demostrado que la acción de la leptina es directa sobre la TRH por medio del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (Stat-3) [145, 146]. Otros datos indican que la acción de la leptina sobre la expresión de TRH es mediante la estimulación de la liberación de α -MSH que actuaría sobre neuronas que expresan TRH [146-148]. En nuestro laboratorio se ha demostrado que la acción ejercida por la α -MSH solo es posible cuando el sistema hipotalámico de la TRH se encuentra intacto, ya que, cuando se administra a los animales un agonista de los receptores MC3 y 4 (melanotan II: MTII) sólo se observa un incremento de la presión arterial sistólica y un aumento en los niveles de TRH si los animales no son tratados previamente con un oligonucleótido antisense para la preproTRH. Lo que nos lleva a proponer que la activación del eje leptina-melanocortina-TRH puede explicar el incremento en la presión arterial [149].

HIPÓTESIS

Nuestras hipótesis de trabajo fueron:

- 1) El peso al nacer es condicionante para el desarrollo de las enfermedades asociadas al síndrome metabólico.
- 2) Además, el peso al nacer genera una mayor susceptibilidad al desarrollo de estas enfermedades cuando los animales son expuestos a la ingesta de una dieta rica en grasas.
- 3) El peso anormal al nacer conllevaría una alteración del eje leptina-TRH, lo que produciría que estos animales sean obesos e hipertensos en la adultez.
- 4) El desarrollo de las enfermedades asociadas al síndrome metabólico se encuentra relacionado con una expresión diferencial de genes relacionados con el balance energético, principalmente a nivel central.
- 5) Esta expresión diferencial se encuentra estrechamente relacionada con el nivel de metilación de las zonas regulatorias de los genes estudiados.

OBJETIVOS

Debido a todo lo anteriormente expuesto, nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1) Obtener un modelo animal que reprodujese, al menos parcialmente, algunas de las enfermedades asociadas al síndrome metabólico humano, más puntualmente, estudiar si el peso al nacer de los animales es condicionante para el desarrollo de:
 - a) Obesidad,
 - b) Hipertensión,
 - c) Dislipemias,
 - d) Insulino-resistencia
 - e) Esteatosis hepática
- 2) Analizar la influencia del peso al nacer sobre la susceptibilidad de los animales a desarrollar alguna de las enfermedades anteriormente expuestas, cuando son sometidos a la ingesta de una dieta rica en grasas.
- 3) Particularmente nos interesa estudiar si los animales con peso anormal al nacer presentan alguna alteración en los niveles de leptina, TRH y hormonas tiroideas.
- 4) Evaluar si la presencia de estas enfermedades está relacionada con el nivel de expresión de algunos genes relacionados con su fisiopatología tales: como el receptor del péptido similar a glucagon tipo 1, la isoforma beta del receptor de hormonas tiroideas, el receptor tipo 1 de adiponectina, entre otros, que como se verá, se encontraron sobreexpresados en ratones con peso anormal al nacer en

experimentos preliminares utilizando el modelo de restricción de la ingesta materna y evaluando los resultados mediante “macroarrays”.

5) Finalmente, estudiar si esta diferencia en la expresión de genes corresponde a una metilación diferencial de los mismos de acuerdo al peso al nacer de los animales.

Materiales y Métodos



Diseño experimental

Utilizamos ratas de la cepa Wistar y ratones CF1 de ambos sexos, de 10 semanas de edad que fueron alojados en forma individual y criados en el bioterio de la Institución. Dos semanas antes de que los animales fueran puestos en apareo, las hembras se separaron en 2 grupos que recibieron distintas dietas: uno de ellos fue alimentado con la dieta standard rata-ratón (Cooperación, San Nicolás, Bs. As, Argentina) y el otro con una dieta rica en grasa (ver figura 1), que estuvo constituida por el alimento balanceado mencionado suplementado con un 40% de grasa (en partes iguales de vacuna y porcina). En la tabla 1 se muestran los contenidos calóricos de ambas dietas y en la tabla 2 se detalla la composición de la dieta standard. Todos los animales recibieron agua *ad libitum* y fueron alojados bajo un ciclo luz: oscuridad de 12:12 hs. (luz de 8:00 a 20:00 hs).

| tipo de alimento | Energía Metabolizable Kcal/kg |
|------------------|----------------------------------|
| comida standard | 2900-3100 |
| comida grasa | 5340-5460 |

Tabla 1: Energía metabolizable de las dietas utilizadas.

| Composición | % |
|-------------------------|---------|
| Humedad (máx) | 12 |
| Proteína (mín) | 23 |
| Extracto etéreo (mín) | 5 |
| Fibra cruda (máx) | 6 |
| Minerales Totales (máx) | 10 |
| Calcio (mín-máx) | 1-1,4 |
| Fósforo (mín-máx) | 0,5-0,8 |
| Cloro | 0,3 |
| Sodio | 0,2 |
| Potasio | 0,7 |
| Magnesio | 0,2 |
| Azufre | 0,16 |

Tabla 2: Composición porcentual de la dieta standard.

Durante la primera semana se dejó que las hembras se acostumbraran a la dieta mientras que en la segunda semana se midió el consumo de alimento a cada animal. Cada grupo además fue separado en dos subgrupos, los que recibieron o bien el alimento correspondiente *ad libitum* o con un 30% de restricción [50] según el consumo individual de cada animal. La restricción dietaria comenzó al separarse las hembras de los machos luego de tres días de apareo y finalizó entre los días 16 y 18 de gestación [50]. Los machos fueron alimentados durante todo el experimento con la dieta standard *ad libitum*.

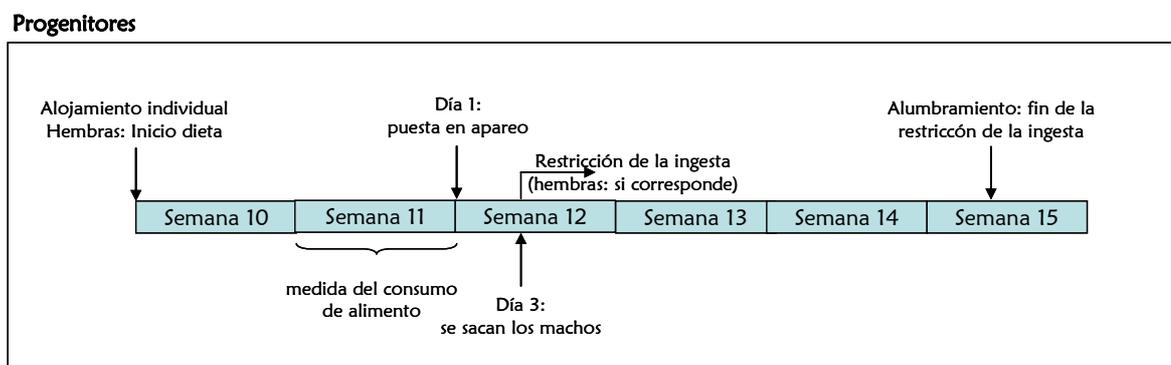


Figura 1: Esquema del protocolo utilizado para los progenitores.

El trabajo con animales de bajo peso al nacer implica una importante mortalidad, lo que nos llevó a tener que manejar un número de animales muy grande para poder obtener un número razonable por grupo de peso. Por ejemplo, en el experimento de las ratas de 35 semanas, al momento del nacimiento fueron 170 animales en total, 31 de los cuales no llegaron a la semana de vida, lo que fue muy frecuente entre los animales con bajo peso al nacer, ésto nos impidió utilizar el mismo criterio que se usa en humanos para determinar el corte de bajo y alto peso (esto es 2 desvíos estándar con respecto a la media poblacional). Al momento del destete, el número de animales fue de 139, de éstos había 9 machos y el mismo

número de hembras clasificados como de bajo peso al nacer, y 9 hembras y 12 machos clasificados como de alto peso al nacer, el resto eran normo peso. Además existen en la literatura trabajos en los que se utiliza una restricción, ya sea calórica o proteica, mayor de la utilizada por nosotros, y en los que se han obtenido animales con diferencias más marcadas con respecto a sus controles, pero nosotros consideramos que una mayor restricción en la ingesta implicaba el riesgo de un menor éxito reproductivo.

En el caso de los ratones, utilizados con un día de vida, las crías fueron pesadas y sexadas el día del nacimiento y sacrificadas por decapitación. Se separó el diencéfalo, y se guardó a -80°C al que luego se le realizó una extracción de RNA.

Para las ratas, también pesadas y sexadas al nacimiento, además fueron individualizadas desde el día del nacimiento, y pesadas diariamente hasta el destete y luego semanalmente (ver figura 2). Además se tomó la medida del largo del cuerpo el día del nacimiento, a las 10 semanas de vida y antes del sacrificio. A partir de las 12 semanas se les midió la presión arterial por el método indirecto descrito más adelante. A la semana 18 de vida se separaron los animales en dos grupos: dieta normal y dieta grasa (cuya composición ya ha sido mencionada anteriormente).

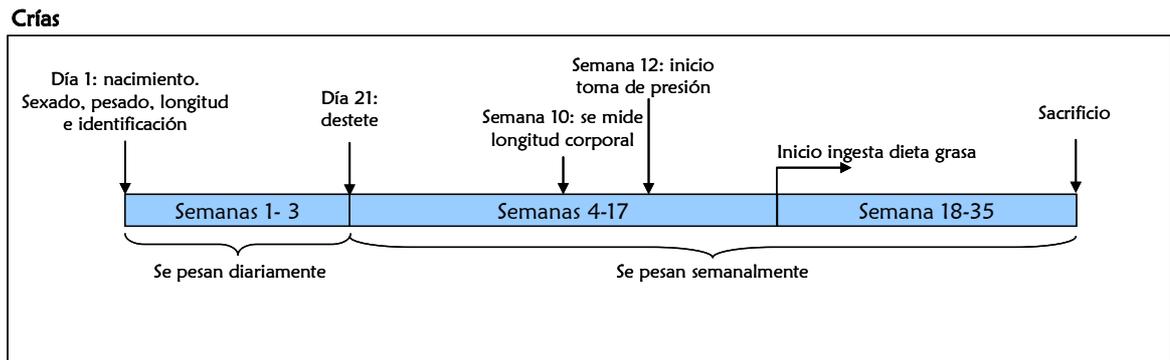


Figura 2: Esquema del protocolo utilizado para las crías.

Al momento del sacrificio, en la semana 35 de vida, los animales fueron decapitados y se les extrajo sangre en un tubo con EDTA para luego separar el plasma, se separó diencéfalo e hígado que fueron guardados en hielo seco al momento de la extracción y luego a -80°C hasta ser procesados. Del diencéfalo se extrajo RNA, DNA y una tercera porción para cuantificar el contenido de TRH. Se guardó una porción del hígado en formol para realizar una tinción con hematoxilina-eosina para observar el grado de esteatosis del tejido por microscopía óptica y de otra porción se realizó una extracción de RNA. Además se extrajo todo el tejido adiposo y se pesó.

Medida de presión arterial indirecta

Para la determinación indirecta de la presión arterial, se utilizó el método plestimográfico de la cola. Los animales fueron colocados en un habitáculo para mantenerlos inmóviles, luego se les colocó en la cola un mango ocluser de acrílico y látex, conectado a un manómetro de presión, a un transductor de presión tipo Statham y a un sistema de insuflado de aire para colapsar la arteria y registrar la

presión arterial. Se colocó además un sensor de pulso en la cola. La señal de presión y de pulso se registró mediante un sistema de digitalización desarrollado especialmente en nuestro laboratorio, conectado a una PC con software que registró la aparición y desaparición del pulso luego de la oclusión. Se tomó como valor de presión arterial la obtenida en el momento en el que el pulso reaparecía al descomprimir el mango ocluser, este valor representó el nivel de presión arterial sistólica en mmHg. Esta medición se llevó a cabo por triplicado en cada animal y se tomó la media como valor definitivo con una variación no mayor del 10%.

Procesamiento de tejidos para cuantificar el contenido de TRH

Para las mediciones de TRH en diencéfalo, se extrajo el cerebro inmediatamente luego de la decapitación y se disecó siguiendo las comisuras sobre una placa de hielo para separar el diencéfalo. Luego fueron hervidos por 20 min. a baño maría en una solución (Acido acético 2M, HCl 10mM [142]) que evita la degradación del tripéptido y la aparición de péptidos similares a la TRH (pGlu-glu-proNH₂, pGlu-phe-proNH₂, etc) que por tener gran similitud en su estructura tiene entrecruzamiento con los antisueros policlonales anti-TRH [150]. Luego fueron homogeneizados en un homogeneizador politrón y centrifugadas a 10000 rpm durante 20 min. a 4°C. Los precipitados fueron utilizados para la cuantificación de proteínas, los sobrenadantes, liofilizados se resuspendieron en un volumen apropiado del buffer del radioinmunoensayo previa verificación del pH cercano a 7,4 y luego se utilizaron para la cuantificación del péptido.

Cuantificación de TRH por radioinmunoensayo

La cuantificación de TRH se realizó mediante un RIA desarrollado en nuestro laboratorio [142]. El mismo consistió en la incubación a 4°C durante 18 a 24hs de una mezcla de reacción constituida por 100 µl de la hormona marcada radioactivamente (aprox. 10000 cpm por tubo) + 100 µl de anticuerpo anti-TRH en la dilución seleccionada + 100 µl del péptido sintético en concentraciones crecientes desde 3,9 a 1000 pg. Finalizada la incubación fueron agregados 200 µl de una mezcla de carbón activado-dextran T-70, se agitó y luego de dejar 20 min en reposo se centrifugó a 4°C 20 min. a 3000 rpm en una centrífuga refrigerada. Una vez aspirado el sobrenadante, la radioactividad del precipitado (¹²⁵I-TRH libre) fue cuantificada en un contador gamma automático. En cada ensayo realizado adicionalmente a la curva standard se incorporaban 3 tubos con el péptido marcado (100 µl) llevando a volumen final con el agregado de buffer (para cuantificar el binding inespecífico) y otros 3 tubos con el péptido marcado, el buffer y el anticuerpo (para el binding total).

El buffer utilizado estaba compuesto por: NaH₂PO₄ 50mM, BSA 0,01%, PMSF 0.1mM, EDTA 5mM, 100U/ml de aprotinina, azida sódica 0,02% a pH: 7,4 [142].

Determinación del contenido de proteínas

El contenido de proteínas fue determinado por la técnica de Lowry [151], utilizando albúmina bovina como Standard. Luego de la homogenización ácida y

centrifugación del tejido, el precipitado fue disuelto en NaOH 1M en la dilución apropiada para la cuantificación.

Extracción de RNA total

El RNA total fue extraído a partir del tejido disecado inmediatamente después de la decapitación de los animales. La extracción se realizó siguiendo la técnica basada en la extracción con fenol-cloroformo del RNA utilizando tiocianato de guanidina [152]. Los tejidos congelados se pulverizaron en un mortero colocado sobre una placa de hielo seco. Luego se los homogenizó en 1ml de solución de lisis (solución D: Tiocianato de Guanidina 4M, citrato de sodio 25mM, sarcosyl 0.5% agregándose 7.2 μ l de β -mercaptoetanol en el momento de su utilización) con homogenizador tipo polytron durante 1 min. Luego, a 0.5 ml de muestra se agregaron 0.1 volúmenes de acetato de sodio (2M pH=4), un volumen de solución de fenol saturado en agua, se agitó y se dejó en hielo durante 15 min. Se agregaron 0.2 volúmenes de cloroformo: isoamílico (49:1) se agitó y se dejó en hielo durante 15 min. Se centrifugó a 4°C durante 15 min. a 15000 rpm. Se recuperó la fase acuosa; luego se agregó un volumen de isopropanol se agitó y se guardó a -20°C durante por lo menos una hora. Las muestras se volvieron a centrifugar para precipitar el RNA a 4°C durante 15 min. a 15000 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 150 μ l de solución D, se reprecipitó el RNA por el agregado de 1 volumen de isopropanol y una segunda incubación de 1 hora a -20°C, luego se centrifugó a 4°C durante 15 min. a 15000 rpm, se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con etanol 80%, se secó y resuspendió en

agua. Para la cuantificación del RNA se utilizó un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260nm. Todas las drogas fueron de calidad molecular y tanto las soluciones como el material utilizado se autoclavaron luego del agregado del inhibidor de RNAsas dietilpirocarbonato (DEPC).

Evaluación de la expresión génica por “macroarrays”

Debido a que no existen “arrays” para rata que presenten genes relacionados a nuestro tema de estudio, decidimos realizar un primer acercamiento a la expresión diferencial de genes mediante la utilización de ratones, con el fin de poder utilizar un “macroarray” comercial.

El RNA procedente de los diencéfalos de los ratones de un día de vida fue utilizado en un “macroarray” para evaluar si existía expresión diferencial de genes relacionados al síndrome metabólico. Para esto utilizamos el Oligo GEArray System OMM-017 HybTube (SuperArray Bioscience Corp. MD, USA). Brevemente, una vez realizada la extracción del RNA con el protocolo manual arriba mencionado, las muestras fueron purificadas utilizando un kit comercial (ArrayGrade Total RNA isolation kit, SuperArray Bioscience Corp. MD, USA), luego se realizó la síntesis del cDNA seguido por la síntesis del cRNA, paso que incluye la marcación (con Biotin 11-UTP, Perkin Elmer, MA, USA) y amplificación del RNA (TrueLabeling-AMP 2.0, SuperArray Bioscience Corp. MD, USA). El producto obtenido fue purificado utilizando el ArrayGrade cRNA Cleanup Kit (SuperArray Bioscience Corp. MD, USA), el eluido obtenido de las columnas fue utilizado en la hibridización de las membranas. Una vez realizada la hibridización los cRNA unidos a las membranas

fueron reconocidos mediante el uso del Chemiluminiscent Detection Kit (SuperArray Bioscience Corp. MD, USA) y las membranas fueron expuestas sobre una placa Kodak Biomax MS utilizando un cassette Kodak Biomax MS con pantalla intensificadora. La imagen obtenida fue escaneada para ser evaluada por medio del GEMatrix Expression Analysis Suite (<http://GEASuite.superarray.com>, SuperArray Bioscience Corp. MD, USA). La lista de genes representados en estos arrays se encuentra en la tabla 3.

| Número RefSeq | Símbolo | Descripción |
|---------------|-----------|---|
| NM_008084 | Gapdh | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase |
| NM_197985 | Adipor2 | Adiponectin receptor 2 |
| NM_028320 | Adipor1 | Adiponectin receptor 1 |
| NM_009605 | Adipoq | Adiponectin, C1Q and collagen domain containing |
| NM_009625 | Adcyap1 | Adenylate cyclase activating polypeptide 1 |
| NM_007407 | Adcyap1r1 | Adenylate cyclase activating polypeptide 1 receptor 1 |
| NM_009633 | Adra2b | Adrenergic receptor, alpha 2b |
| NM_007419 | Adrb1 | Adrenergic receptor, beta 1 |
| NM_007420 | Adrb2 | Adrenergic receptor, beta 2 |
| NM_013462 | Adrb3 | Adrenergic receptor, beta 3 |
| NM_007427 | Agrp | Agouti related protein |
| NM_007468 | Apoa4 | Apolipoprotein A-IV |
| NM_009730 | Atrn | Attractin |
| NM_007540 | Bdnf | Brain derived neurotrophic factor |
| NM_009766 | Brs3 | Bombesin-like receptor 3 |
| NM_009778 | C3 | Complement component 3 |
| NM_007587 | Calca | Calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha |
| NM_007588 | Calcr | Calcitonin receptor |
| NM_018782 | Calcl | Calcitonin receptor-like |
| NM_013732 | Cartpt | CART prepropeptide |
| NM_031161 | Cck | Cholecystokinin |
| NM_009827 | Cckar | Cholecystokinin A receptor |
| NM_025469 | Clps | Colipase, pancreatic |
| NM_007726 | Cnr1 | Cannabinoid receptor 1 (brain) |
| NM_009924 | Cnr2 | Cannabinoid receptor 2 (macrophage) |
| XM_984218 | Zfp91 | Zinc finger protein 91 |
| NM_016673 | Cntfr | Ciliary neurotrophic factor receptor |

| | | |
|-----------|-------|---|
| NM_007754 | Cpd | Carboxypeptidase D |
| NM_013494 | Cpe | Carboxypeptidase E |
| NM_007762 | Crhr1 | Corticotropin releasing hormone receptor 1 |
| NM_009953 | Crhr2 | Corticotropin releasing hormone receptor 2 |
| NM_010076 | Drd1a | Dopamine receptor D1A |
| NM_010077 | Drd2 | Dopamine receptor 2 |
| NM_007877 | Drd3 | Dopamine receptor 3 |
| NM_007878 | Drd4 | Dopamine receptor 4 |
| NM_013503 | Drd5 | Dopamine receptor 5 |
| NM_010253 | Gal | Galanin |
| NM_008082 | Galr1 | Galanin receptor 1 |
| NM_010254 | Galr2 | Galanin receptor 2 |
| NM_015738 | Galr3 | Galanin receptor 3 |
| NM_008100 | Gcg | Glucagon |
| NM_008101 | Gcgr | Glucagon receptor |
| NM_008117 | Gh | Growth hormone |
| NM_010284 | Ghr | Growth hormone receptor |
| NM_021488 | Ghrl | Ghrelin |
| NM_177330 | Ghsr | Growth hormone secretagogue receptor |
| NM_021332 | Glp1r | Glucagon-like peptide 1 receptor |
| NM_175681 | Glp2r | Glucagon-like peptide 2 receptor |
| NM_201615 | Prlhr | Prolactin releasing hormone receptor |
| NM_145132 | Mchr1 | Melanin-concentrating hormone receptor 1 |
| NM_010341 | Nmur1 | Neuromedin U receptor 1 |
| NM_175012 | Grp | Gastrin releasing peptide |
| NM_008177 | Grpr | Gastrin releasing peptide receptor |
| NM_010410 | Hcrt | Hypocretin |
| NM_198959 | Hcrt1 | Hypocretin (orexin) receptor 1 |
| NM_198962 | Hcrt2 | Hypocretin (orexin) receptor 2 |
| NM_008285 | Hrh1 | Histamine receptor H 1 |
| NM_133849 | Hrh3 | Histamine receptor H 3 |
| NM_008312 | Htr2c | 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2C |
| NM_010491 | Iapp | Islet amyloid polypeptide |
| NM_010554 | Il1a | Interleukin 1 alpha |
| NM_008361 | Il1b | Interleukin 1 beta |
| NM_008362 | Il1r1 | Interleukin 1 receptor, type I |
| NM_010555 | Il1r2 | Interleukin 1 receptor, type II |
| NM_031168 | Il6 | Interleukin 6 |
| NM_010559 | Il6ra | Interleukin 6 receptor, alpha |
| NM_008386 | Ins1 | Insulin I |
| NM_008387 | Ins2 | Insulin II |
| NM_010568 | Insr | Insulin receptor |
| NM_008493 | Lep | Leptin |
| NM_010704 | Lepr | Leptin receptor |
| NM_008561 | Mc3r | Melanocortin 3 receptor |
| NM_016977 | Mc4r | Melanocortin 4 receptor |

| | | |
|--------------|----------|---|
| NM_021325 | Cd200r1 | CD200 receptor 1 |
| NM_026523 | Nmb | Neuromedin B |
| NM_008703 | Nmbr | Neuromedin B receptor |
| NM_019515 | Nmu | Neuromedin U |
| NM_153079 | Nmur2 | Neuromedin U receptor 2 |
| NM_023456 | Npy | Neuropeptide Y |
| NM_010934 | Npy1r | Neuropeptide Y receptor Y1 |
| NM_008731 | Npy2r | Neuropeptide Y receptor Y2 |
| NM_016708 | Npy5r | Neuropeptide Y receptor Y5 |
| NM_008173 | Nr3c1 | Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 |
| NM_008745 | Ntrk2 | Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2 |
| NM_024435 | Nts | Neurotensin |
| NM_018766 | Ntsr1 | Neurotensin receptor 1 |
| NM_008747 | Ntsr2 | Neurotensin receptor 2 |
| NM_011011 | Oprk1 | Opioid receptor, kappa 1 |
| XM_001052051 | Oprm1 | Opioid receptor, mu 1 |
| NM_011014 | Oprs1 | Opioid receptor, sigma 1 |
| NM_008895 | Pomc1 | Pro-opiomelanocortin-alpha |
| NM_011144 | Ppara | Peroxisome proliferator activated receptor alpha |
| NM_011146 | Pparg | Peroxisome proliferator activated receptor gamma |
| NM_008904 | Ppargc1a | Peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha |
| NM_011201 | Ptpn1 | Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1 |
| NM_145435 | Pyy | Peptide YY |
| NM_019511 | Ramp3 | Receptor (calcitonin) activity modifying protein 3 |
| NM_019972 | Sort1 | Sortilin 1 |
| NM_009215 | Sst | Somatostatin |
| NM_009217 | Sstr2 | Somatostatin receptor 2 |
| NM_009380 | Thrb | Thyroid hormone receptor beta |
| NM_013693 | Tnf | Tumor necrosis factor |
| NM_009426 | Trh | Thyrotropin releasing hormone |
| NM_021290 | Ucn | Urocortin |
| XM_910603 | Ucn2 | Urocortin 2 |
| NM_031250 | Ucn3 | Urocortin 3 |
| NM_009463 | Ucp1 | Uncoupling protein 1 (mitochondrial, proton carrier) |
| NM_011671 | Ucp2 | Uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier) |
| NM_009464 | Ucp3 | Uncoupling protein 3 (mitochondrial, proton carrier) |
| L08752 | PUC18 | PUC18 Plasmid DNA |
| N/A | Luc1 | Luciferase, a 61 kDa monomeric protein (firefly, SA_oligo1) |
| X65316 | Luc2 | Luciferase, a 61 kDa monomeric protein (firefly, SA_oligo2) |

| | | |
|-----------|----------|--|
| SA_00005 | AS1R2 | Artificial Sequence 1 Related 2 (80% identity)(48/60) |
| SA_00004 | AS1R1 | Artificial Sequence 1 Related 1 (90% identity)(54/60) |
| SA_00003 | AS1 | Artificial Sequence 1 |
| NM_024277 | Rps27a | Ribosomal protein S27a |
| NM_009735 | B2m | Beta-2 microglobulin |
| NM_008302 | Hsp90ab1 | Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1 |
| NM_008302 | Hsp90ab1 | Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1 |
| NM_008907 | Ppia | Peptidylprolyl isomerase A |
| NM_008907 | Ppia | Peptidylprolyl isomerase A |
| SA_00007 | BAS2C | Biotinylated Artificial Sequence 2 Complementary sequence |
| SA_00007 | BAS2C | Biotinylated Artificial Sequence 2 Complementary sequence |

Tabla 3: detalle de los genes representados en los macroarrays utilizados.

Retrotranscripción

Para un 1 µg de RNA se agregaron 50 ng de random primers, se incubó 5 minutos a 70°C y luego a 4°C y se agregó a cada tubo una mezcla conteniendo: M-MLV Buffer 5X, dNTP's 10mM, inhibidor de RNAsas 12.5 unidades (RNAsin, Promega), M-MLV-RT 100 unidades (Promega) (volumen final de reacción 12.5µl con agua libre de RNAsas), se incubó 60 minutos a 37°C y luego 10 minutos a 95°C.

Extracción de DNA

Se colocó una porción del tejido en 400 µl de buffer de lisis (TRIS 0.01M, NaCl 0.017M y EDTA 0.001) junto con 40 µl de SDS 10% y 20 µl de proteinasa K (10 mg/ml) se incubó overnight a 55°C y luego se continuó el protocolo agregando

un volumen de fenol saturado en agua, se mezcló por inversión durante 3 minutos y se centrifugó a 4°C 15 minutos a 4000 rpm. Se recuperó la fase acuosa y se le agregó un volumen de fenol: cloroformo: isoamílico (relación volumétrica 25:24:1) se mezcló por inversión durante 3 minutos y se centrifugó a 4°C 15 minutos a 4000 rpm, una vez más se recuperó la fase acuosa y se agregó un volumen de cloroformo, se mezcló por inversión durante 3 minutos y se centrifugó a 4°C 15 minutos a 4000 rpm se volvió a recuperar la fase acuosa y se le agregaron 2 volúmenes de etanol 100% y 0.1 volúmenes de NaCl 3M, se mezcló por inversión 3 minutos y se guardó a -20°C 30 minutos para permitir la precipitación del DNA, luego se centrifugó a 4°C 30 minutos a 12000 rpm, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol 70% y se dejó secar, luego se resuspendió con agua estéril.

Real Time PCR:

1.- para evaluar expresión:

Luego de realizada la retrotranscripción, las muestras se diluyeron 1/5 y se utilizaron 5µl de las mismas por tubo de reacción.

Las secuencias de los primers utilizados y sus temperaturas de annealing se detallan en la tabla 4A, todos los primers fueron diseñados para rata. En todos los casos utilizamos el gen de β -actina como control de expresión.

| Gen | Secuencia Primers | long. del producto | tejido utilizado | Temp de Annealing |
|---|------------------------------|--------------------|------------------|---|
| Glp1R (glucagon like peptide receptor 1) | Upper CCTGAGGAACAGCTCCTGTGTC | 146 pb | DC | 68°C |
| | Lower GCAAACAGGTTTCAGGTGGAT | | | |
| ThRβ (receptor de hormonas tiroideas isoforma beta) | Upper GGGTACCACTATCGCTGCAT | 323 pb | DC | 68°C |
| | Lower TTGATGAGCTCCCATTCTC | | | |
| Zfp91 (zinc finger protein 91) | Upper TCTTGCTCACCTCGCTATT | 103 pb | DC | 66°C |
| | Lower GAGCCTGAAGAGTCGTCCAC | | | |
| AdipoR1 (receptor tipo 1 de adiponectina) | Upper TGGCAACATCTGGACACATT | 296 pb | DC | 68°C |
| | Lower GCTGTGGGGAGCAGTAGAAG | | | |
| Actb (beta actina) | Upper TTCCTGGGTATGGAATCCTG | 136 pb | DC/hígado | misma temp. del gen con el que se va a comparar |
| | Lower CAGCAATGCCTGGGTACAT | | | |
| Pai-1 (plasminogen activator inhibitor 1) | Upper CAAGATGCTATGGGATTCAA | 115 pb | hígado | 58°C |
| | Lower AGGTCCCGCTGGACAAAGAT | | | |
| Tnf (tumor necrosis factor alpha) | Upper CCACGCTCTTCTGTCTACTG | 128 pb | hígado | 62°C |
| | Lower GGCTACGGGCTTGTCACTC | | | |

Tabla 4A: secuencia de los primers utilizados para expresión.

2.- para evaluar metilación:

Hidrólisis del DNA con la enzima HpaII

Se utilizaron 3 µg de DNA los cuales se incubaron con Buffer 4 10X (NEB), 2 unidades de HpaII (NEB) y cantidad necesaria de agua para obtener un volumen final de reacción de 20 µl. La incubación se realizó a 37°C durante toda la noche. Para cada muestra tratada de este modo se preparó un tubo conteniendo la muestra y todos los componentes de la reacción excepto la enzima de restricción (sirve de referencia para controlar que la enzima haya cortado) y además se

preparó otro tubo con enzima y sin DNA (blanco). La enzima HpaII es una enzima sensible a metilación [153-155], esto significa que sólo es capaz de reconocer su secuencia de corte (CCGG) si ésta no se encuentra metilada. Esta propiedad de la enzima nos permite luego, mediante la utilización de primers que amplifican una zona que contiene al menos un sitio de corte para la enzima, discriminar si el sitio a estudiar se encontraba o no metilado (ya que se compara la misma muestra tratada y sin tratar con la enzima).

La zona del gen de GLP1R que elegimos para evaluar la metilación fue una secuencia de 105 pb ubicada a 252 pb río arriba del sitio de inicio del primer exón; esta secuencia se encuentra en una zona identificada por el programa Methprimer (<http://www.urogene.org/methprimer/>) como una isla CpG (compuesta por 336 pb y con un contenido de GC mayor al 60%) y cuenta con un sitio de corte para la enzima HpaII. A modo de ejemplo, en la figura 3 se puede observar en la parte superior la secuencia ingresada en el Methprimer y en la inferior el gráfico generado por el programa indicando la posición de la isla CpG (marcada en color en la parte superior).

En el gen del ZFP91, la secuencia utilizada para estudiar el grado de metilación, fue una secuencia de 268 pb ubicada a 677 pb río arriba del sitio de inicio del primer exón. Los primers utilizados amplifican una secuencia que comprende un isla CpG completa y parte de una segunda isla (identificadas por el programa MethPrimer), la primer isla mencionada esta compuesta por 145 pb y la segunda se encuentra a 24 pb río abajo de la otra isla y consta de 408 pb. La

secuencia amplificada con los primers elegidos corresponde a una zona que cuenta con dos sitios de corte para la enzima HpaII.

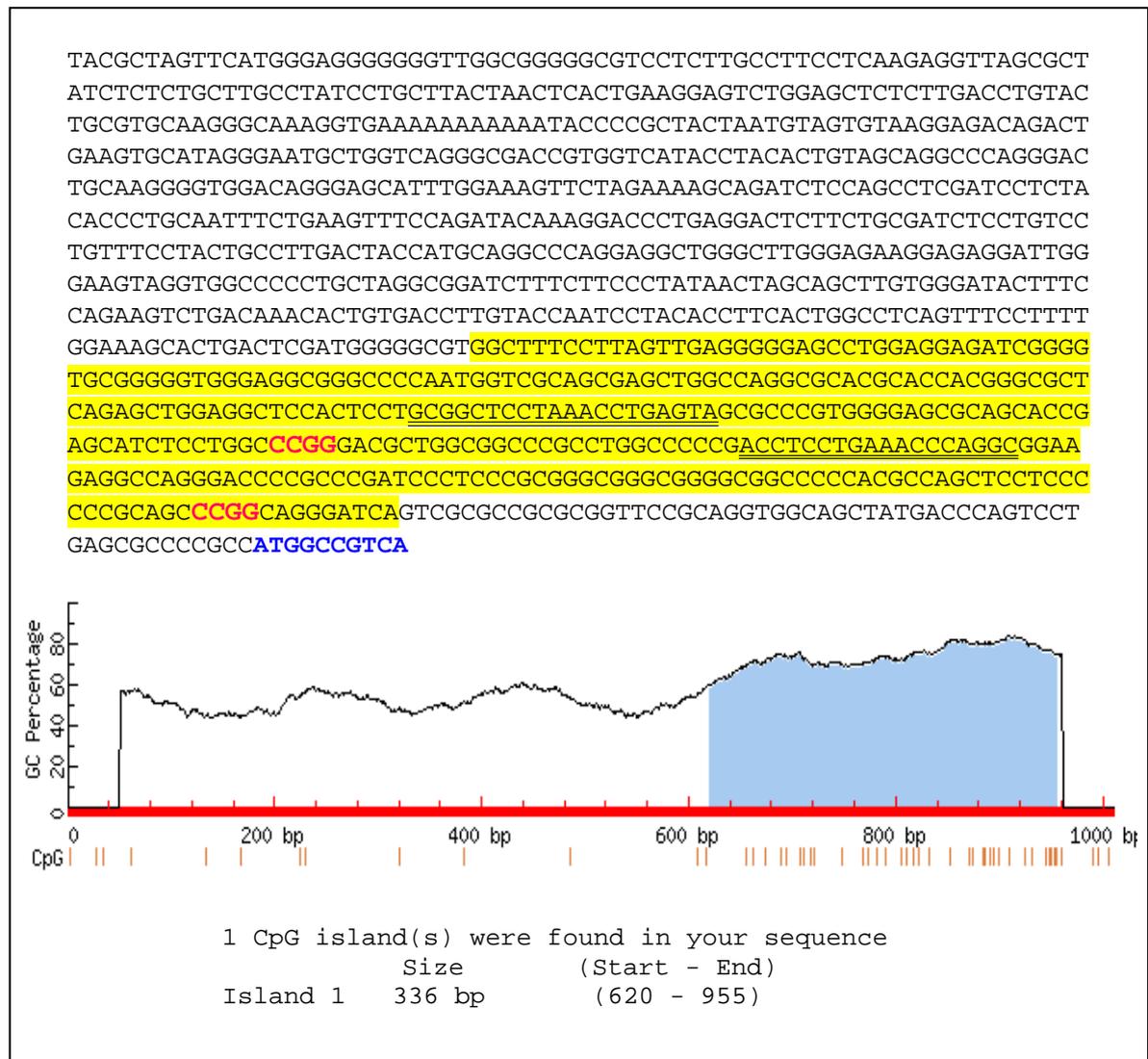


Figura 3: Panel superior: secuencia de GLPIR ingresada en el Methprimer para obtener la ubicación de la isla CpG. La secuencia resaltada es la isla arrojada por el methprimer, subrayado doble: primers elegidos para amplificar la zona. En rojo se marca la secuencia reconocida por la enzima HpaII. En letras azules se marca el exón 1. Panel inferior: imagen generada por el programa Methprimer, en celeste se marca la isla CpG.

Una vez realizado el corte con la enzima de restricción se inactivó la enzima incubando a 65°C durante 20 minutos luego las muestras se diluyeron para obtener una concentración de DNA de 0,075 µg/µl (dilución 1/10) de modo de realizar la

PCR con 75 ng de DNA, pipeteando 5 μ l de muestra. Los primers y las temperaturas de annealing utilizados para evaluar metilación se encuentran detallados en la tabla 4B.

| Gen | Secuencia Primers | long. del producto | tejido utilizado | Temp de Annealing |
|-------------------------|----------------------------|--------------------|------------------|-------------------|
| Glp1R metilación | Upper GCGGCTCCTAAACCTGAGTA | 105 pb | DC | 68°C |
| | Lower GCCTGGGTTTTCAGGAGGT | | | |
| Zfp91 metilación | Upper ACAGAAAAGCCAGAGCAGGA | 268 pb | DC | 68°C |
| | Lower CGACAATCCCAAAGTGACCT | | | |

Tabla 4B: secuencia de los primers utilizados para metilación.

En todos los casos la mezcla de reacción de la PCR consistió en: dNTP's 25mM, Mg²⁺ 50mM, Buffer 10X, Primers 40 μ M, Sybr Green 10X, el volumen final de reacción fue de 20 μ l. Se realizó hot start por lo que la TAQ polimerasa (Invitrogen) se agregó luego de incubar los tubos durante 30 segundos a 95°C, para esto se realizó una dilución de la TAQ (2 unidades por tubo de reacción) de modo de pipetear 1 μ l en cada tubo y además, debido a que luego de esta breve incubación se abren los tubos para agregar la TAQ, se agregó inicialmente mineral oil para prevenir la evaporación. El protocolo de las PCR fue:

| | | |
|-------------------------------------|---|-----------|
| 1' 95° C | } | 1 ciclo |
| 15" 95° C | | 40 ciclos |
| 30" Temp de annealing (ver tabla 3) | | |
| 30" 72° C | | |
| 5' 72° C | | 1 ciclo |

Análisis histológico del tejido hepático

Los hígados fueron fijados en formol 10%, se fijaron en parafina y se realizaron cortes de 5 μm que fueron teñidos con hematoxilina eosina para el análisis histológico. La evaluación histológica de los cortes fue realizada a ciegas por un mismo hepatopatólogo. La esteatosis, la actividad necroinflamatoria y la fibrosis fueron determinadas de acuerdo al sistema desarrollado por Brunt y colaboradores [156] que se detalla en la siguiente tabla:

| Evaluación de: | Grado 0 | Grado 1 | Grado 2 | Grado 3 | Grado 4 |
|--|----------|---|---------------------------------------|-----------------|----------|
| Esteatosis (% de hepatocitos con grasa macro o microvesicular) | ausencia | <33% | 33-66% | >66% | - |
| actividad necroinflamatoria | - | mínimo | moderado | severo | - |
| fibrosis | ausencia | fibrosis perivenular y/o perisinusoidal en zona 3 | fibrosis combinada pericelular portal | fibrosis septal | cirrosis |

Tabla 5: Clasificación de Brunt utilizada para evaluar esteatosis, actividad inflamatoria y fibrosis.

La esteatohepatitis no alcohólica se definió por la presencia de:

- ⇒ esteatosis más cualquier estado de fibrosis o
- ⇒ esteatosis más inflamación lobular más degeneración balonizante [156].

Determinaciones bioquímicas

Los valores de triglicéridos, colesterol total, colesterol HDL y glucemia se

obtuvieron mediante un autoanalizador marca Architect utilizando reactivos Abbot (para colesterol el método de la oxidasa; para triglicéridos el método de Wako modificado y para la glucosa el de la Hexoquinasa). Las hormonas tiroideas fueron determinadas mediante los métodos de MEIA (Enzimo Inmuno Ensayo de Micropartículas) para T₃ y FPIA (Inmuno Ensayo de Luz Polarizada) para T₄.

Determinación de leptina plasmática

Se utilizó un kit comercial de ELISA (Mouse Leptin ELISA Kit, Crystal Chem Inc., Il, USA). Este kit posee un 90% de cruzamiento con leptina de rata. Se realizó una dilución 1/2 del plasma con el diluyente de muestras. El rango de detección del kit fue de 0,2 pg/ml a 12,8 pg/ml.

Determinación de insulina plasmática

Se utilizó un kit comercial de ELISA (Ultra Sensitive Rat Insulin ELISA Kit, Crystal Chem Inc, Il, USA). Se realizó una dilución 1/2 del plasma con el diluyente de muestras, se utilizaron 5 µl de esta dilución. El rango de detección del kit estuvo comprendido entre 0,1 ng/ml y 12,8 ng/ml.

Cálculo del índice de insulino resistencia (HOMA)

Para el cálculo del índice HOMA se utilizó la siguiente formula [157]:

$$\text{HOMA} = \frac{[\text{insulina } (\mu\text{UI/ml})] \times [\text{glucosa (mmol/L)}]}{22.5}$$

Análisis estadístico

Se realizó ANOVA factorial (con medidas repetidas donde correspondía) con contrastes post-hoc, en el caso de las variables que no presentaron distribución normal se las normalizó mediante transformación logarítmica y luego se aplicó el mismo test estadístico. Para las correlaciones se utilizó el test de Spearman. Para la evaluación de variables discretas se realizó un test de regresión multinominal ordinal con función probit. Para todos los cálculos se utilizó el software Statistica 6.0 (StatSoft, Inc, USA).

Resultados



Caracterización del modelo experimental

Nuestro primer paso fue confirmar que la restricción dietaria y/o la administración de dieta grasa produjeran una variación en el peso al nacer de los animales. Como se puede observar en la figura 1, la administración de dieta grasa, ya sea *ad libitum* o restringida, ocasionó el nacimiento de animales de menor peso corporal que la dieta control (independientemente de si ésta fue administrada *ad libitum* o en forma restringida). Esto se observó claramente en ambos sexos (HEMBRAS: dieta grasa $p=0.001$ y dieta grasa restringida $p=0.002$ vs dieta normal y dieta grasa $p=0.002$, dieta grasa restringida $p=0.01$ vs dieta normal restringida; MACHOS: dieta grasa $p=0.04$, dieta grasa restringida $p=0.01$ vs dieta normal y dieta grasa $p=0.01$, dieta grasa restringida $p=0.003$ vs dieta normal restringida).

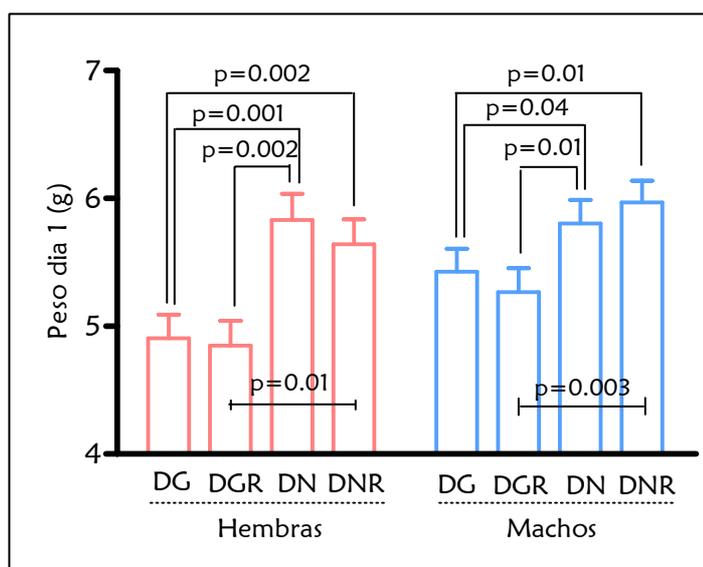


Figura 1: Peso al nacer de los animales, según dieta recibida por la madre. DG: dieta grasa, DGR: dieta grasa restringida, DN: dieta normal y DNR: dieta normal restringida.

Como de cualquier manera existía cierta superposición entre las crías de las diferentes camadas, se procedió a clasificar a los animales en bajo peso, alto peso y normo peso, utilizando el Z score (valor - media/desvío standard) tomándose como bajo peso (BP) a los animales con $Z \leq -1$ y alto peso (AP) a los de $Z \geq 1$, quedando como normales (NP) los de $-1 < Z < 1$ (esto es según percentilo 15 y 85 respectivamente).

En la figura 2 puede observarse la curva de crecimiento de las crías durante el período mencionado, entre las hembras obtuvimos que los animales nacidos con alto peso mantuvieron un peso superior con respecto a los normales durante todo el período ($p=0.000001$). Las hembras de bajo peso, comparadas con las normales presentaron pesos distintos desde el nacimiento hasta el día 12 de vida ($p=0.04$) pero a partir del día 13 equipararon sus pesos con los controles. Mientras que los machos, tanto los de bajo como los de alto peso permanecieron con pesos distintos a los normales hasta el momento del destete (AP y BP: $p=0.02$ vs NP).

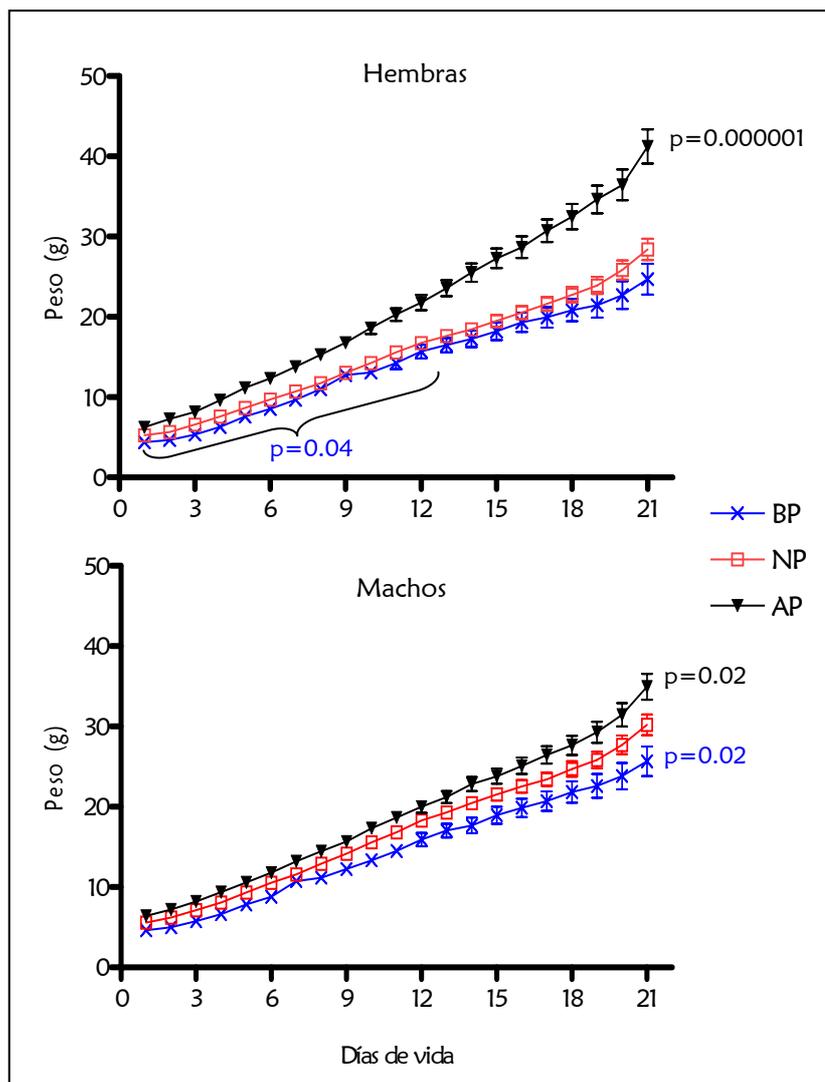


Figura 2: Curvas de pesos de los animales desde el nacimiento hasta el destete (día 21). Panel superior hembras, inferior machos. BP: bajo peso, NP: normo peso y AP: alto peso.

Luego del destete se continuó pesando a los animales, durante las primeras semanas ésto se realizó con una frecuencia semanal para luego pasar a realizarlo cada 2 semanas. La curva de pesos desde el destete hasta la semana 17 de vida, momento en que los animales se distribuyeron en dieta grasa (DG) o normal (DN), se puede observar en la figura 3. Las hembras de bajo peso al nacer no presentaron diferencias de peso con las normo peso, mientras que las de alto peso se mantuvieron con un peso superior a las normo peso durante todo el período ($p=0.002$). Entre los machos, los de bajo peso al nacer se mantuvieron con un peso

inferior con respecto a los normo peso hasta la semana 4 de vida ($p=0.03$) a partir de ese momento y hasta la semana 17 los pesos se igualaron en ambos grupos. Los machos de alto peso al nacer a pesar de tener un peso mayor al destete presentaron un peso similar a los normo peso en la semana 4 manteniéndose así hasta la semana 17.

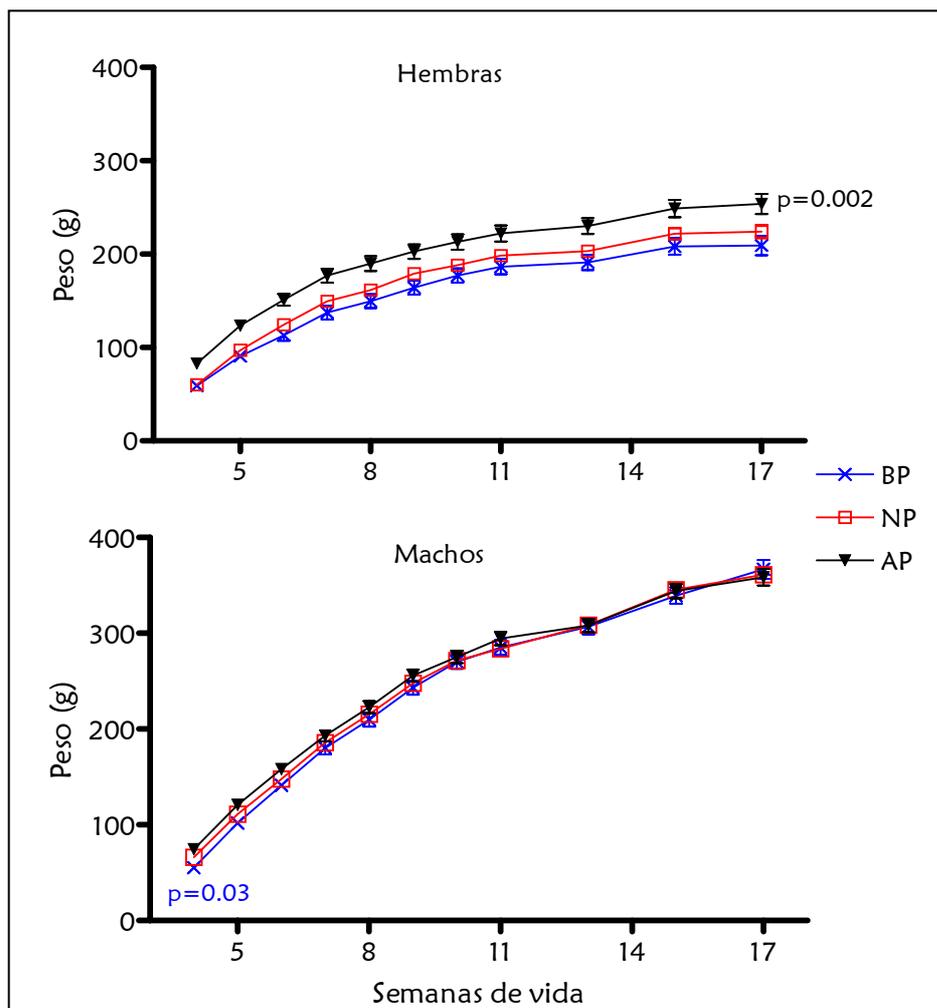


Figura 3: Curvas de crecimiento de los animales luego del destete hasta la semana 17 de vida. Panel superior hembras, inferior machos. BP: bajo peso, NP: normo peso y AP: alto peso.

Influencia del peso al nacer sobre la susceptibilidad a la dieta grasa

Con el fin de estudiar si los animales nacidos con peso anormal eran más susceptibles a desarrollar obesidad, se los sometió, a la semana 18 de vida, al consumo de una dieta con un alto contenido de grasa. Los animales se separaron en dos grupos de dieta (dieta normal y dieta grasa, ambas *ad limitum*) y se continuó pesándolos cada 2 semanas hasta el momento del sacrificio (semana 35).

Dado que, como se mencionó previamente, el síndrome metabólico se caracteriza por la presencia de por lo menos 3 de las siguientes 5 enfermedades: obesidad central, dislipidemia, bajo contenido de colesterol HDL, diabetes e hipertensión arterial, decidimos medir estos parámetros en los animales para ver si encontrábamos algún tipo de asociación entre la presencia de estas enfermedades y el peso al nacer del animal.

En la figura 4 se observa la ganancia de peso de los animales durante el período mencionado. Las hembras que ingirieron dieta grasa ganaron más peso que las del mismo grupo pero alimentadas con dieta normal (BP $p=0.0004$ $n=5$, NP $p=0.00004$ $n=10$ DN y 11 DG y AP $p=0.0002$ $n=4$ DN y 3 DG), además las hembras de alto peso que ingirieron dieta grasa ganaron más peso que las de normo peso de la misma dieta ($p=0.03$ $n=11$ NP y 3 AP). Mientras que entre los machos se observó un resultado similar por la ingesta de dieta grasa en todos los grupos de peso (BP: $p=0.015$ $n=5$, NP: $p=0.04$ $n=9$ DN y 10 DG y AP: $p=0.02$ $n=5$ DN y 6 DG). Además, al momento del sacrificio se pesó el tejido adiposo para determinar la relación entre tejido

adiposo y la longitud corporal, que se grafica en la figura 5. En las hembras, en el grupo de dieta normal, encontramos que las de bajo peso al nacer presentaron una relación TA/long corporal superior a las normo y alto peso ($p=0.01$ vs NP $n=5$ BP y 10 NP y $p=0.006$ $n=5$ vs AP). Al ingerir dieta grasa todos los grupos aumentaron la relación TA/long corporal (BP $p=0.04$ $n=5$, NP $p=0.0004$ $n=11$ y AP $p=0.00001$ $n=3$ vs mismo peso DN), las hembras de alto peso no presentaron diferencias significativas con las de bajo peso, pero ambos grupos de peso anormal al nacer mostraron una relación significativamente superior a los de normo peso de la misma dieta (BP y AP $p=0.04$). Los machos solo presentaron diferencias al ingerir dieta grasa (BP $p=0.0003$ $n=6$ DN y 5 DG; NP $p=0.001$ $n=10$ DN y 11 DG; AP $p=0.01$ $n=7$ DN y DG), los de bajo peso presentaron una mayor relación TA/long corporal que los normo y alto peso ($p=0.04$ vs NP y $p=0.01$ vs AP).

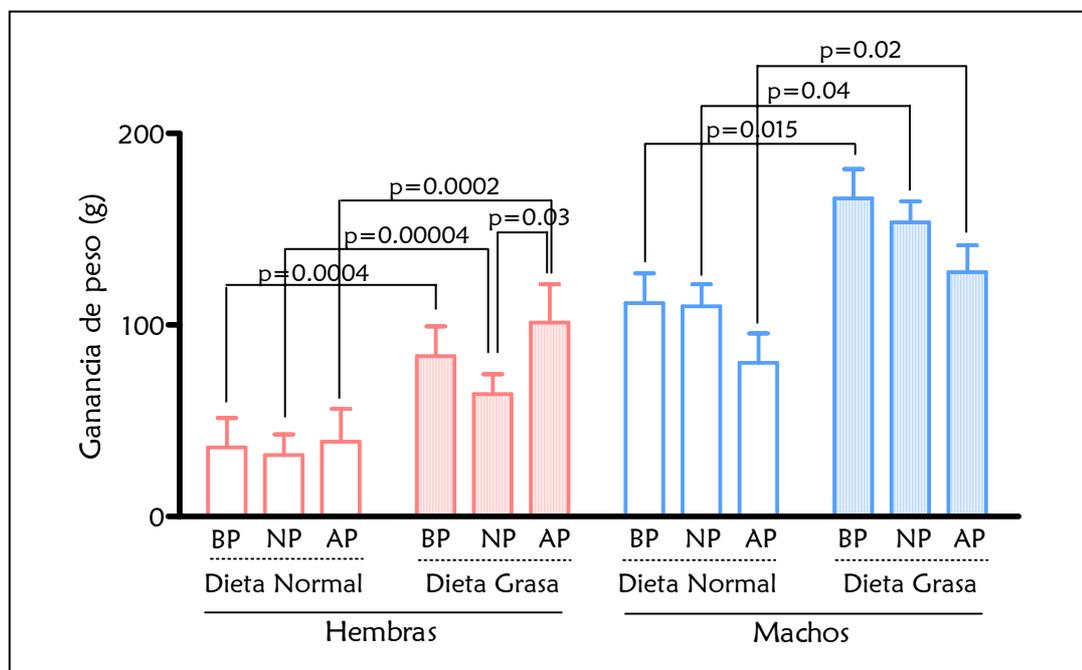


Figura 4: Ganancia de peso de los animales según sexo, dieta consumida y peso al nacer. BP: bajo peso, NP: normo peso y AP: alto peso.

Como era de esperar, encontramos una correlación positiva entre la ganancia de peso corporal y el contenido de tejido adiposo de los animales ($r=0.57$ $p=1 \times 10^{-7}$ $n=76$, figura 6).

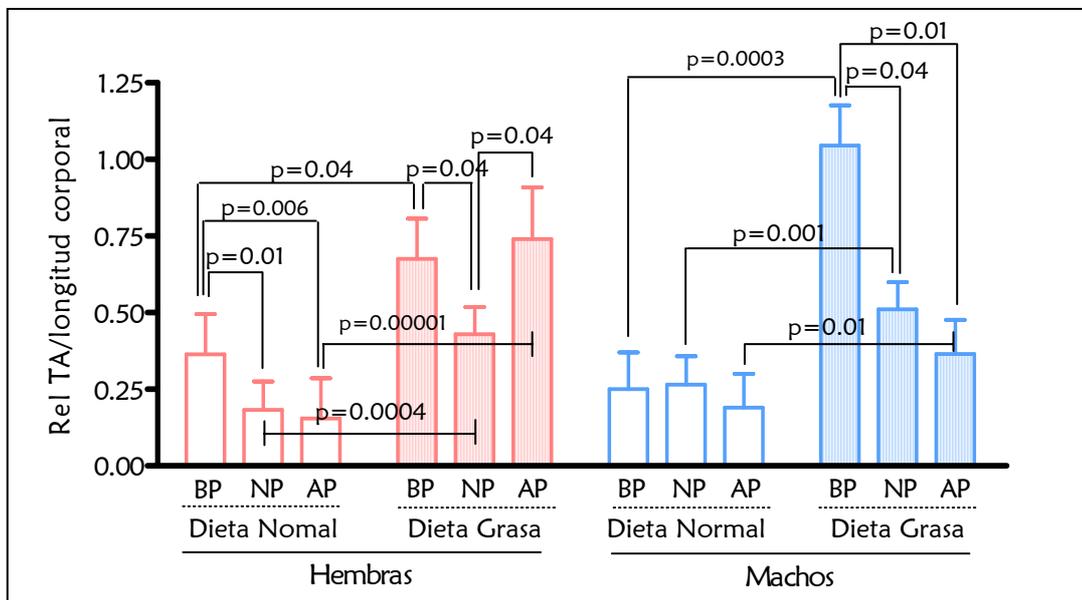


Figura 5: Relación peso del tejido adiposo/ longitud corporal. BP: bajo peso, NP: normo peso y AP: alto peso.

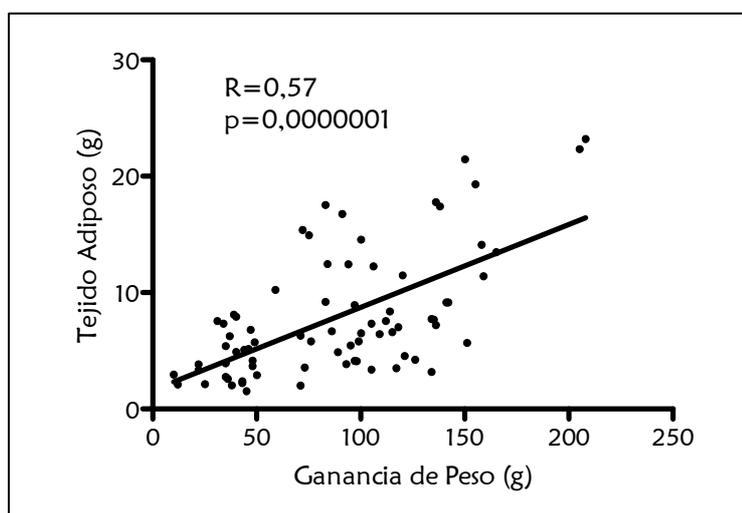


Figura 6: Correlación entre la ganancia de peso y el peso del tejido adiposo.

Debido a que el tejido adiposo es productor de leptina y esta hormona ejerce un importante rol sobre el peso corporal y la ingesta, decidimos determinar

la concentración de leptina plasmática. Observamos que las hembras de bajo peso al nacer que recibieron dieta normal tenían aumentados los niveles de leptina con respecto a las de normo peso y alto peso de la misma dieta ($p=0.04$ $n=4$ BP y 6 NP vs normo peso y $p=0.01$ $n=4$ AP vs alto peso). Además las hembras normo y alto peso que recibieron dieta grasa presentaron un aumento de los niveles de leptina con respecto a las del mismo grupo de dieta normal (NP: $p=0.004$ $n=5$ y AP: $p=0.00007$ $n=3$). Entre los machos se vio que los de alto peso al nacer presentaron menores niveles de leptina plasmática que los de bajo peso, indistintamente de la dieta ingerida (DN: $p=0.01$ $n=5$ BP y 7 AP y DG: $p=0.02$ $n=3$ BP y 7 AP). Además todos los grupos mostraron un aumento significativo del nivel de leptina al consumir dieta grasa (BP: $p=0.02$; NP: $p=0.04$ y AP: $p=0.04$) (figura 7).

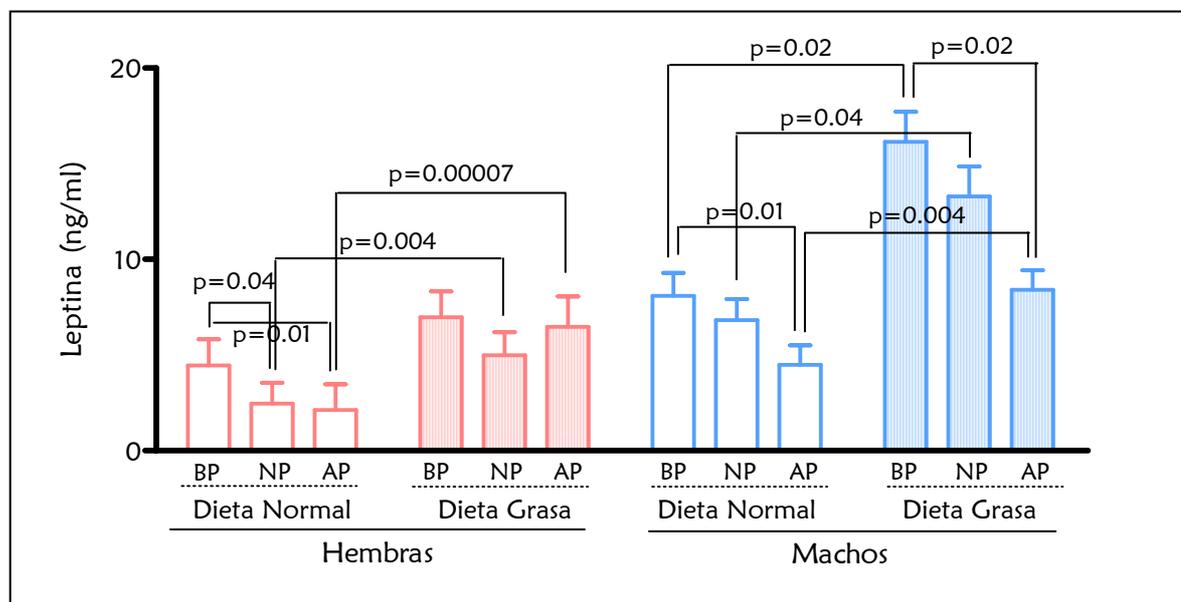


Figura 7: Niveles de Leptina Plasmática. BP: bajo peso, NP: normo peso y AP: alto peso.

Como era de esperar, encontramos una correlación significativa entre los niveles de leptina circulantes y el peso del tejido adiposo ($r=0.75$ $p=1 \times 10^{-10}$ $n=58$), entre la ganancia de peso corporal y la leptina ($r=0.74$ $p=1 \times 10^{-9}$ $n=49$) y entre la relación peso del tejido adiposo/longitud corporal y la leptina ($r=0.73$ $p=2 \times 10^{-10}$ $n=56$) (Figura 8).

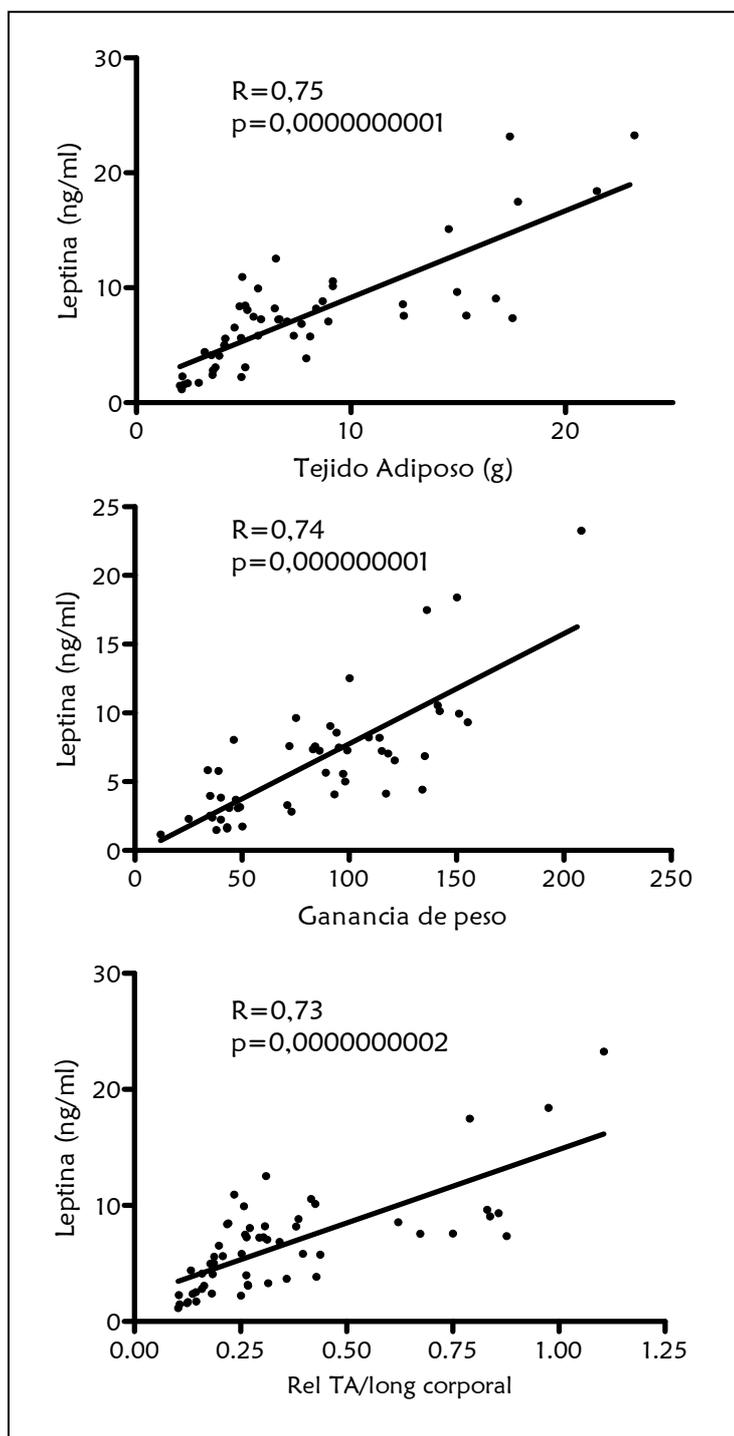


Figura 8: Correlaciones entre nivel de leptina y peso del tejido adiposo (panel superior), leptina y ganancia de peso corporal (panel medio) y la leptina y la relación tejido adiposo/ longitud corporal (panel inferior).

En humanos se utiliza la relación entre colesterol total y colesterol HDL como un indicador de riesgo cardiovascular. Por lo tanto, decidimos calcular este indicador para los animales no observando diferencias entre los grupos (datos no mostrados).

También se midieron los niveles de triglicéridos plasmáticos, sólo se observó un aumento entre los machos normo peso al nacer que presentaron una elevación de este parámetro al recibir dieta grasa (52.8 ± 14.8 vs 90.1 ± 11.0 $p=0.04$ vs mismo peso dieta normal $n=5$ DN y $n=9$ DG).

Con los datos de la glucemia basal de los animales y los niveles de insulina plasmáticos, calculamos el índice de insulino resistencia (HOMA) que se muestra en la figura 9. Las hembras de bajo peso al nacer (dieta normal) presentaron un HOMA menor que las de normo y alto peso ($p=0.005$ $n=5$ BP y 6 NP vs NP y $p=0.006$ $n=4$ vs AP), y al recibir dieta grasa fueron las únicas que mostraron un incremento significativo en el HOMA ($p=0.0008$ $n=4$). Entre los machos de dieta normal, los de alto peso al nacer presentaron un HOMA menor que los normo y bajo peso ($p=0.03$ $n=6$ AP y 5 NP vs NP y $p=0.005$ $n=5$ BP vs AP), al recibir dieta grasa los de normo peso no presentaron diferencias, al contrario que los de bajo y alto peso que vieron incrementado su HOMA (BP: $p=0.02$, $n=3$ y AP $p=0.007$, $n=7$). Dentro del grupo de dieta grasa, los machos de bajo peso tuvieron un HOMA superior a los de alto y normo peso ($p=0.04$ y 0.02 respectivamente).

Encontramos una correlación positiva entre la ganancia de peso y el índice HOMA ($r=0.80$ $p=2 \times 10^{-12}$ $n=54$) y entre la leptina y el HOMA ($r=0.71$ $p=2 \times 10^{-9}$ $n=54$) (Figura 10).

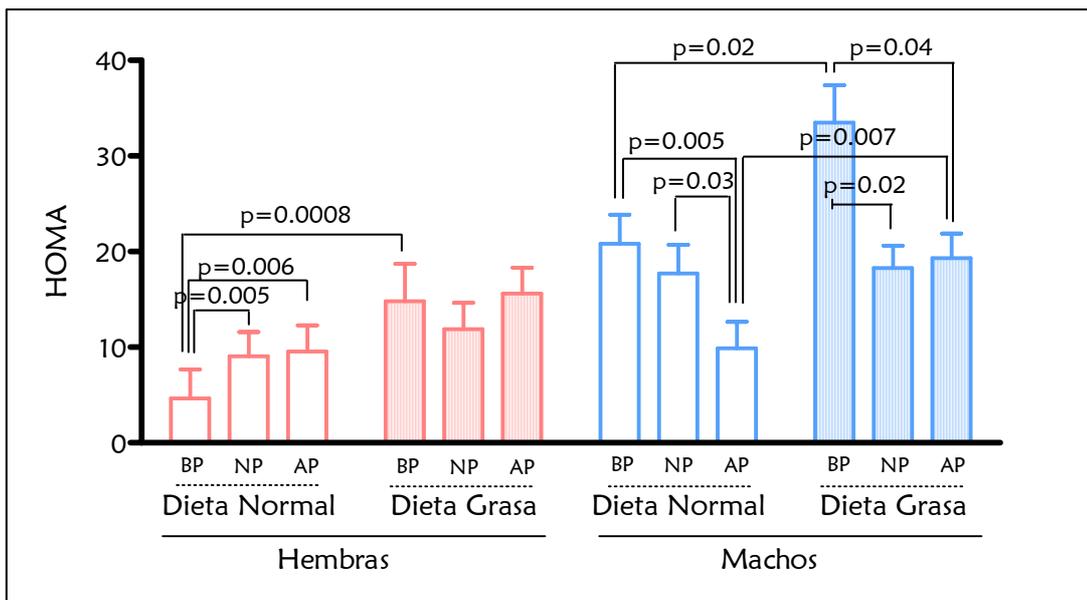


Figura 9: Índice de Insulino Resistencia (HOMA). BP: bajo peso, NP: normo peso y AP: alto peso.

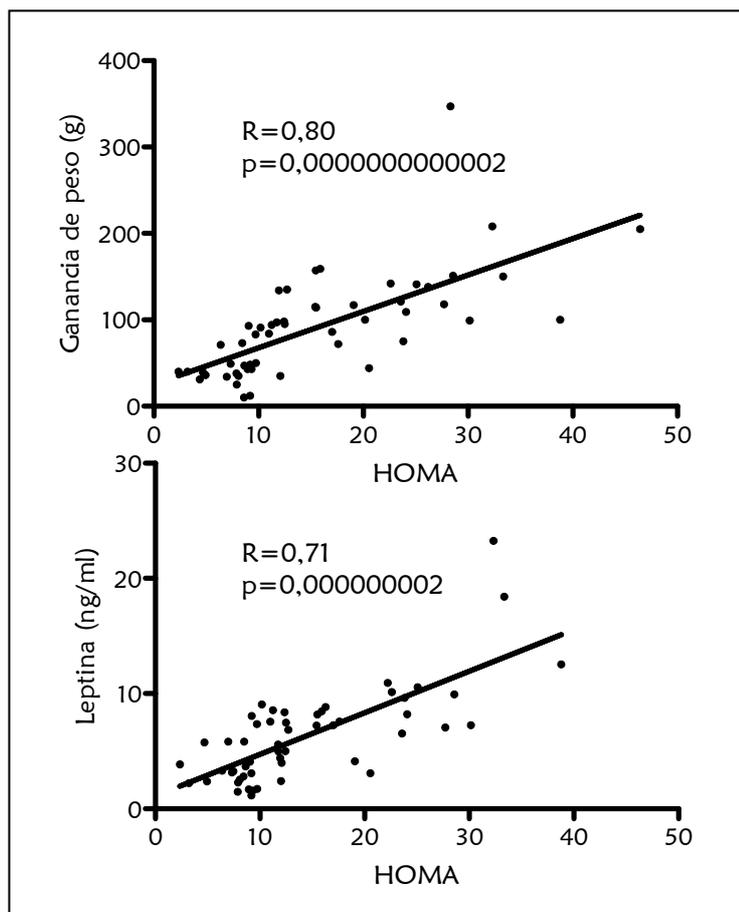


Figura 10: Correlaciones entre Ganancia de peso y HOMA (arriba) y nivel de leptina y HOMA (abajo).

Dado que trabajos previos de nuestro laboratorio y de otros grupos [158, 159] nos indicaban que la ingesta de dieta grasa provoca un incremento en la presión arterial, y que algunos trabajos han encontrado diferencias en la presión arterial de animales con peso anormal al nacer [43, 160-162], decidimos medir la presión arterial sistólica de los animales por el método indirecto. En ambos sexos obtuvimos que los animales de bajo y normo peso que ingirieron dieta grasa tenían la presión arterial sistólica (PAS) elevada con respecto al mismo peso de dieta normal (figura 11), además las hembras de alto peso también presentaron esta diferencia, no así los machos (HEMBRAS: BP: $p=0.04$ $n=5$; NP: $p=0.01$ $n=7$; AP: $p=0.04$ $n=4$ y MACHOS: BP: $p=0.02$, $n=6$ y NP: $p=0.01$ $n=10$ vs mismo peso y sexo dieta normal).

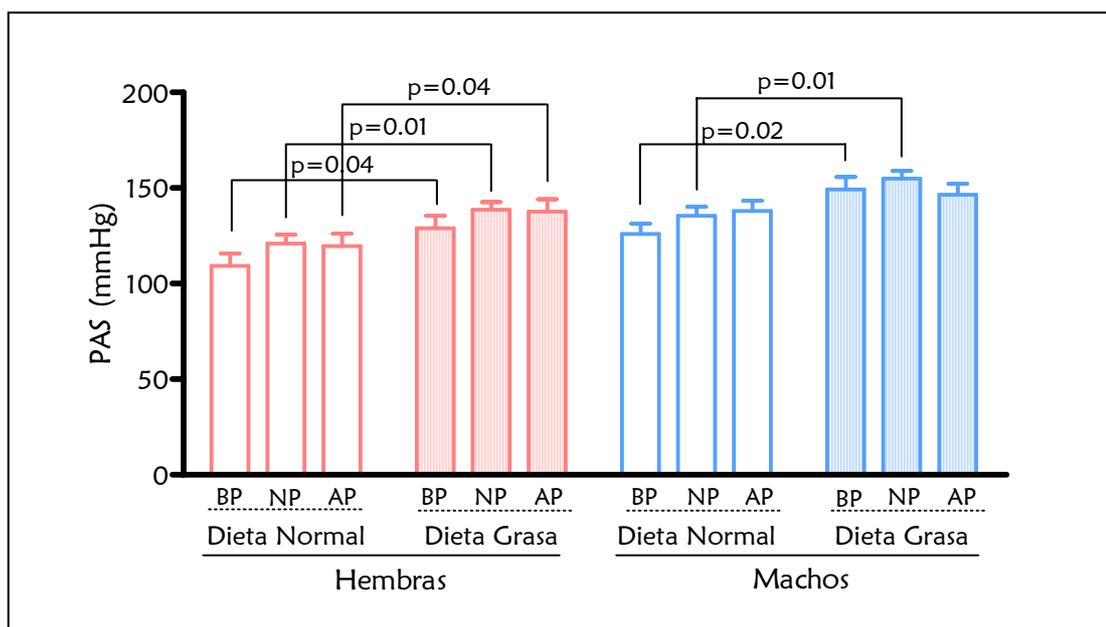


Figura 11: Presión Arterial Sistólica (PAS). BP: bajo peso, NP: normo peso y AP: alto peso.

Además en nuestro laboratorio, se ha observado que el incremento de la presión arterial al ingerir dieta grasa esta acompañado por un aumento en el contenido de TRH en el diencéfalo [163], por lo que medimos este contenido en

los animales. Como se observa en la figura 12, el contenido de TRH en diencéfalo, aumentó por la ingesta de dieta grasa solamente en las hembras normo peso al nacer ($p=0.001$ $n=7$). Además las hembras de bajo peso que ingirieron dieta grasa presentaron un contenido de TRH menor que las normo y alto peso de la misma dieta ($p=0.002$ ambos grupos, $n=4$ BP, 7 NP y 4 AP). Mientras que en los machos se obtuvo que entre los de dieta normal, los de alto peso tuvieron un contenido de TRHd mayor que los normo y bajo peso ($p=0.0001$ ambos grupos, $n=3$ BP, 8 NP y 5 AP). Paradójicamente, al ingerir dieta grasa, los de alto peso al nacer mostraron una disminución en los niveles ($p=0.002$ $n=5$ vs DN).

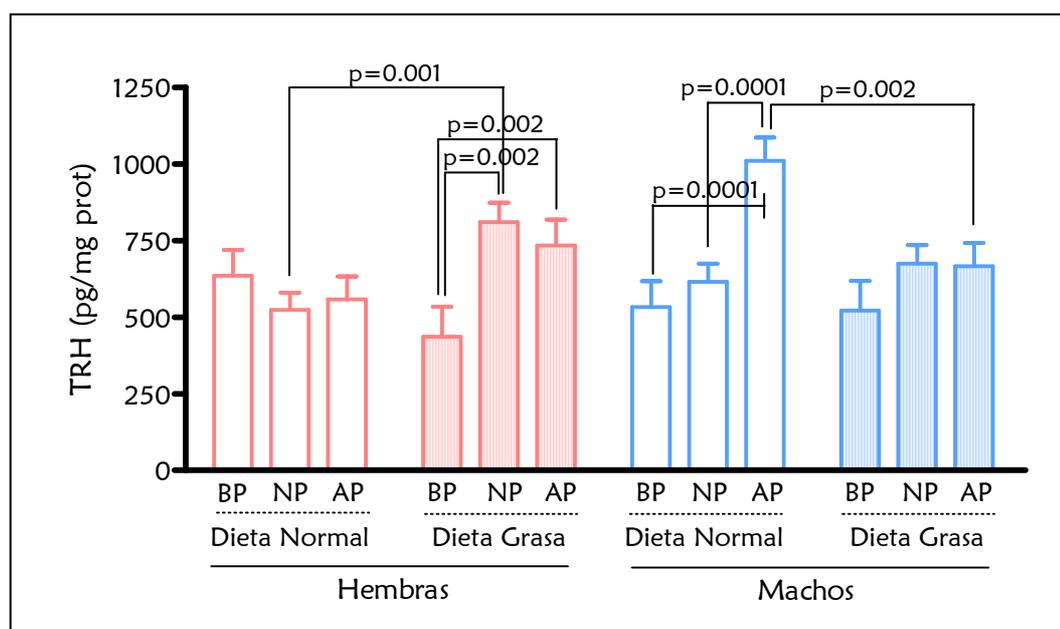


Figura 12: Contenido de TRH en diencéfalo. BP: bajo peso, NP: normo peso y AP: alto peso.

Dado que esperábamos obtener un aumento del contenido de TRH que fuera responsable del incremento de la presión arterial observada en estos animales, a través de un aumento de descarga simpática, debido a la ingesta de dieta grasa y esta asociación no fue del todo clara, decidimos evaluar el estatus tiroideo, ya que

existe una fuerte regulación recíproca entre la TRH y las hormonas tiroideas. En la tabla 1 se observan los valores de T_3 y T_4 obtenidos. Se observó que los machos de normo y alto peso al nacer que ingirieron dieta grasa presentaron aumentados los niveles de T_3 respecto al mismo grupo de dieta normal (NP y AP $p=0.0002$ $n=7$ NP y 6 AP). En el caso de la T_4 , las hembras de peso anormal al nacer (bajo y alto) alimentadas con dieta normal presentaron menores niveles de T_4 que las normo peso de dieta normal (BP vs NP $p=0.002$ $n=5$ BP y 7 NP; AP vs NP $p=0.03$ $n=5$ AP); lo mismo sucedió con los machos de bajo peso de dieta normal (BP vs NP $p=0.008$ $n=6$ ambos grupos). Al ingerir dieta grasa los machos de normo peso mostraron una disminución de la T_4 (DN vs DG $p=0.002$ $n=6$ en ambos grupos). Como puede observarse en la figura 13, las hembras de bajo peso que ingirieron dieta normal presentaron una relación T_3/T_4 superior a las normo peso ($p=0.04$, $n=5$ BP y 3 NP). Al ingerir dieta grasa la diferencia se exacerbó (BP vs NP $p=0.00001$ $n=5$ BP y 4 NP; AP vs NP $p=0.01$ $n=6$ AP). En el caso de los machos, los de bajo peso de dieta normal presentaron una relación T_3/T_4 mayor que los otros dos grupos ($p=0.01$ vs NP $n=6$ BP y 4 NP y $p=0.03$ vs AP $n=5$); además el grupo de bajo peso fue el único que no presentó diferencias en este parámetro al ingerir dieta grasa, ya que tanto los animales de normo como los de alto peso al nacer alimentados con dieta grasa sufrieron un aumento de la relación T_3/T_4 (NP: $p=0.0005$ $n=4$ y AP: $p=0.0003$ $n=5$).

| Sexo | Peso al nacer | Dieta | T ₃ (ng%) | T ₄ (μg%) |
|---------|---------------|--------|----------------------|----------------------|
| Hembras | Bajo Peso | Normal | 65,35 ± 5,77 | 2,47 ± 0,30* |
| | | Grasa | 84,49 ± 5,77 | 3,07 ± 0,30 |
| | Normo Peso | Normal | 54,26 ± 5,27 | 3,61 ± 0,25 |
| | | Grasa | 41,92 ± 5,27 | 4,31 ± 0,22 |
| | Alto Peso | Normal | 64,43 ± 5,77 | 2,81 ± 0,30* |
| | | Grasa | 63,48 ± 6,45 | 3,85 ± 0,33 |
| Machos | Bajo Peso | Normal | 47,42 ± 5,27 | 3,41 ± 0,27* |
| | | Grasa | 30,71 ± 5,77 | 3,27 ± 0,30 |
| | Normo Peso | Normal | 35,46 ± 4,88 | 4,71 ± 0,27 |
| | | Grasa | 61,06 ± 4,88* | 3,17 ± 0,27* |
| | Alto Peso | Normal | 32,94 ± 5,77 | 3,82 ± 0,25 |
| | | Grasa | 63,00 ± 5,77* | 3,42 ± 0,25 |

Tabla 1: Valores de hormonas tiroideas. * p<0.002 vs dieta normal mismo peso al nacer y * p<0.05 vs normo peso misma dieta.

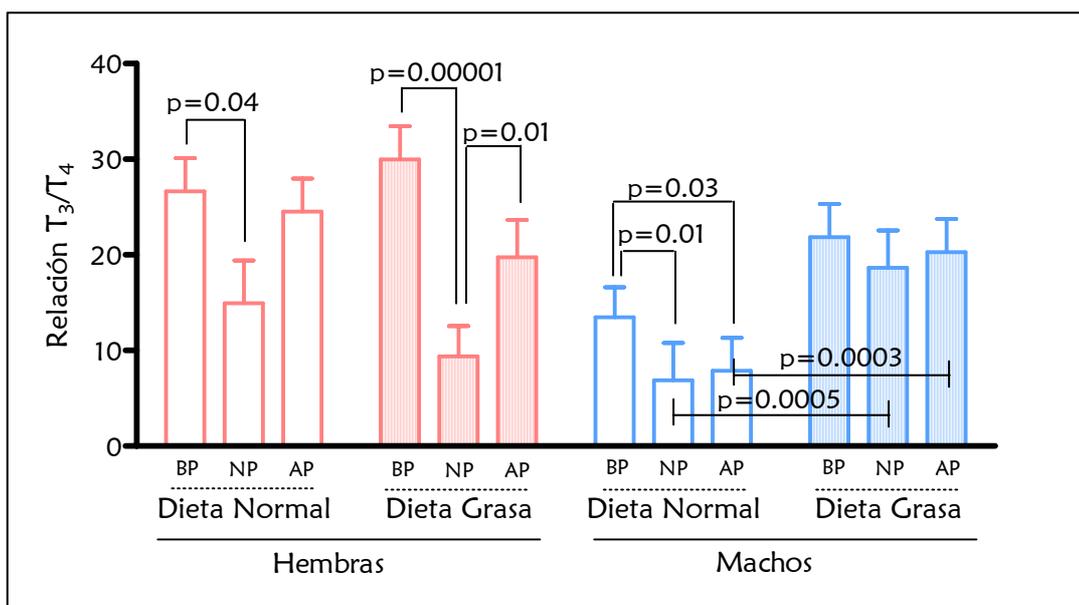


Figura 13: Relación T₃/T₄. BP: bajo peso, NP: normo peso y AP: alto peso.

Por otra parte, esta descrito en la literatura que una dieta rica en grasas provoca el desarrollo de esteatosis hepática [164, 165], por lo que quisimos evaluar el nivel de esteatosis hepática de estos animales. Como se puede observar en las fotos mostradas en las figuras 14 y 15, encontramos que había diferencias significativas entre las dietas ingeridas ($p=0.00002$) indistintamente del peso al nacer y del sexo. En ambas figuras se puede observar que en la columna de la izquierda, que muestra imágenes de animales que ingirieron la dieta control, en su mayoría presentaron una histoarquitectura normal (Fig 14 NP y AP dieta normal; Fig 15 BP y AP dieta normal), mientras que entre las imágenes de la columna de la derecha (de los animales que ingirieron la dieta grasa) se observa esteatosis micro (Fig 14 BP, NP y AP dieta grasa; Fig 15 NP dieta grasa) y macrovacuolar (Fig 14 BP y AP dieta grasa) junto en algunos casos con infiltrado inflamatorio (Fig 14 NP dieta grasa; Fig 15 NP dieta grasa). Además en la Figura 15 (BP dieta grasa) se observa una degeneración balonizante de los hepatocitos (agrandamiento celular).

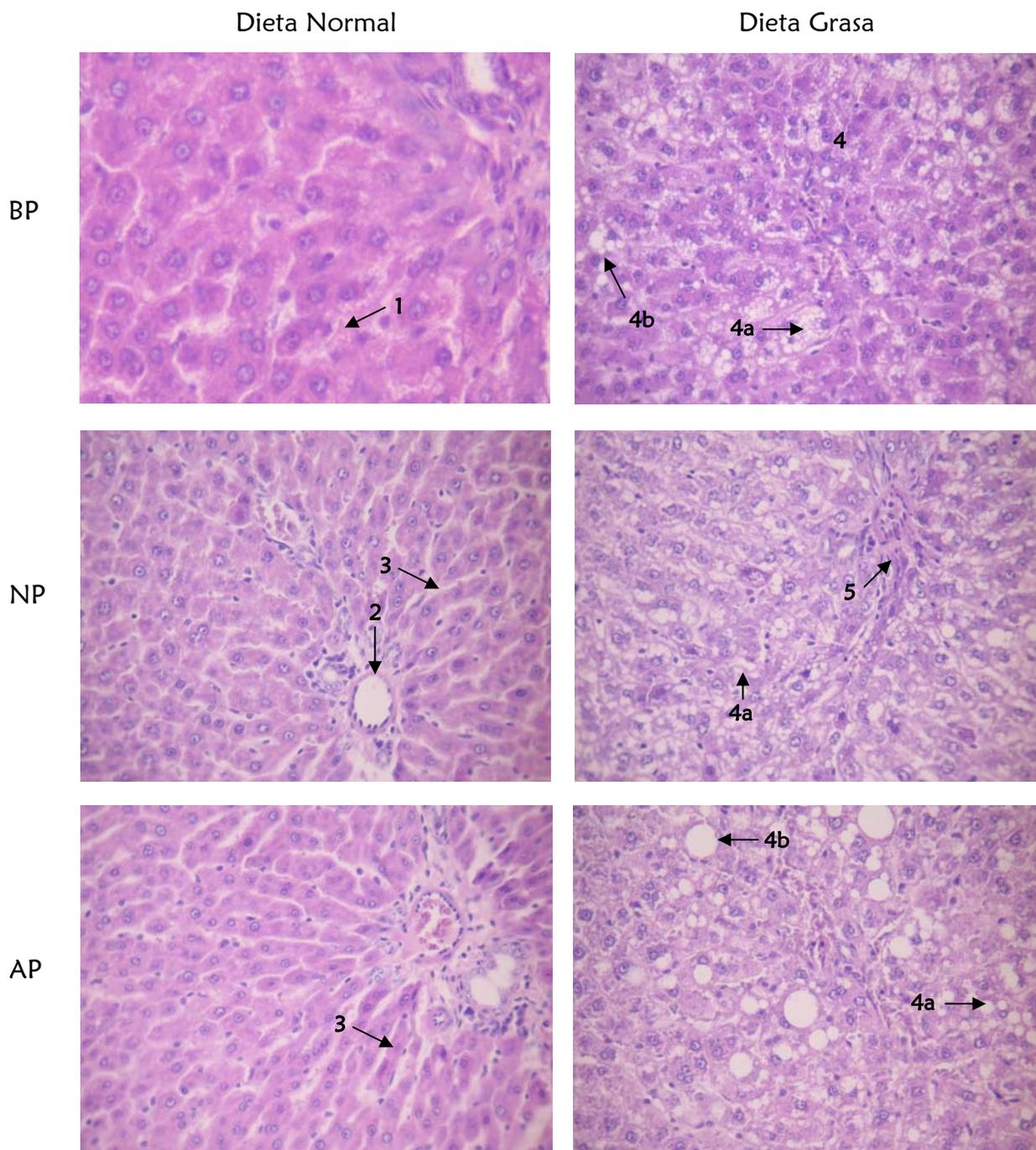


Figura 14: Fotografías obtenidas al microscopio óptico, cortes de hígado teñidos con hematoxilina-eosina, aumento 40x. HEMBRAS. BP: bajo peso; NP: normo peso y AP: alto peso.

Referencias:

1. Esteatosis microvacuolar (grado 2, clasificación de Brunt [156]).
2. Vena central
3. Espacio Porta. Histoarquitectura normal.
4. Esteatosis severa (grado 3, clasificación de Brunt [156]).
 - 4a . Esteatosis microvacuolar
 - 4b . Esteatosis macrovacuolar
5. Infiltrado inflamatorio leve

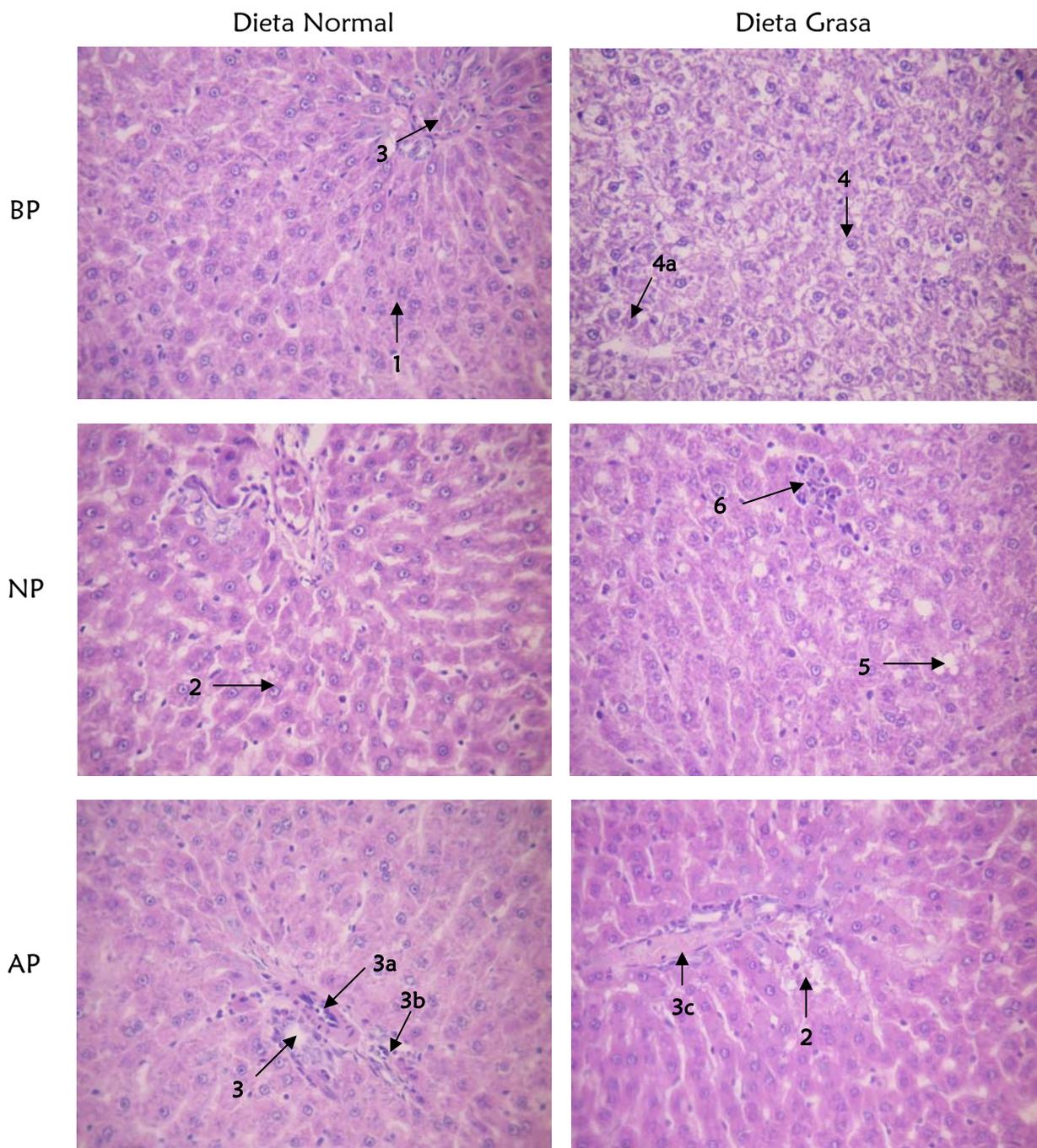


Figura 15: Fotografías obtenidas al microscopio óptico, cortes de hígado teñidos con hematoxilina-eosina, aumento 40x. MACHOS. BP: bajo peso, NP: normo peso y AP: alto peso.

Referencias:

1. Histoarquitectura normal.
2. Esteatosis moderada (clasificación de Brunt [156]).
3. Espacio Porta
 - 3a. Arteria central
 - 3b. Infiltrado inflamatorio mínimo
 - 3c. Vena central
4. Degeneración balonzante de los hepatocitos (clasificación Brunt [156]).
- 4 a. Células de Kupfer
5. Esteatosis microvacuolar.
6. Infiltrado inflamatorio.

Evaluación de la expresión génica

Para poder realizar una aproximación preliminar utilizando “macroarrays” decidimos reproducir el modelo utilizando ratones de la cepa CF1. El tejido elegido para evaluar esta expresión fue el diencéfalo debido a que esta zona del cerebro se encuentra involucrada, como se describió anteriormente, en el control de la ingesta y de la presión arterial, entre otros puntos de nuestro interés. Hallamos algunos genes cuya expresión diencefálica se encontraba alterada en los animales de peso anormal al nacer.

En la figura 16 se muestra la imagen de los arrays utilizados. Los genes que presentaron diferencias se pueden observar en la tabla 2, con flechas negras se marcaron los genes que presentaron una variación en su expresión de entre 1.5 a 2 veces con respecto al grupo de normo peso, mientras que los marcados en color rojo son los que tuvieron una diferencia de 2 veces o más.

De esta manera, los genes marcados en color en la tabla 2 fueron los elegidos para luego evaluar su expresión en el diencéfalo de las ratas (ADIPOR1, GLP1R, ZFP91 y THR β) debido a que eran los únicos que mostraban variación tanto entre sexos como entre pesos al nacer.

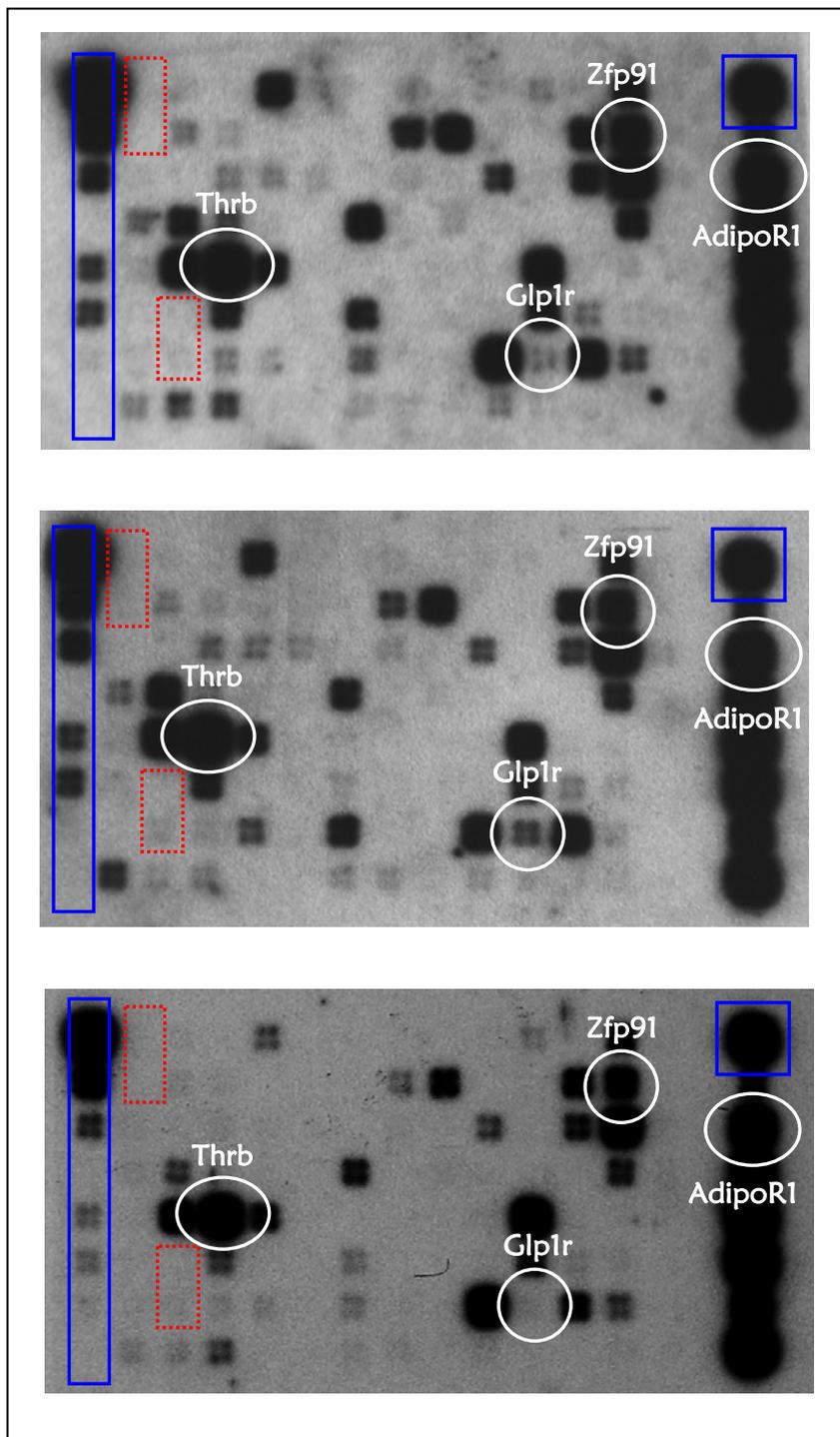


Figura 16: Imagen representativa de la placa radiográfica de los arrays (machos). Arriba: bajo peso, al medio: normo peso y abajo: alto peso. Marcados en azul se encuentran los genes housekeeping y en rojo los blancos.

| Símbolo | HEMBRAS | | MACHOS | |
|----------------|---------|----|--------|----|
| | BP | AP | BP | AP |
| Adipor2 | | ↑ | | |
| Adipor1 | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ |
| Adcyap1 | | | | ↑ |
| Adcyap1r1 | | | ↑ | ↑ |
| Adrb2 | ↓ | | | ↑ |
| Agrp | | ↓ | ↓ | |
| Apoa4 | | | ↓ | |
| Atrn | | | ↓ | ↑ |
| Bdnf | | | | ↑ |
| Brs3 | ↓ | | | |
| Cnr2 | ↓ | | | |
| Zfp91 | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ |
| Cntfr | | ↑ | ↑ | |
| Cpd | | ↑ | | |
| Drd3 | | ↑ | | ↑ |
| Galr1 | | | | ↓ |
| Galr2 | | | | ↑ |
| Ghrl | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ |
| Gip1r | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |
| Hcrtr1 | | | | ↑ |
| Hcrtr2 | | | ↑ | ↓ |
| Hrh3 | | ↑ | | ↑ |
| Il6ra | ↓ | | | |
| Nmbr | | ↑ | | |
| Nmur2 | ↓ | | | |
| Npy | | | | ↓ |
| Oprm1 | ↓ | | | |
| Pparg | | ↑ | | |
| Thrb | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ |
| Tnf | | ↑ | | |
| Trh | | | ↑ | |
| Ucn | | | ↑ | |
| Ucn2 | | ↑ | | |
| Ucn3 | | ↑ | ↑ | |
| Ucp2 | | ↑ | | |

Tabla 2: genes que se encontraron diferencialmente expresados en los ratones de 1 día, expresados respecto al grupo normo peso. BP: bajo peso y AP: alto peso.

Por lo tanto, una vez realizada la caracterización del modelo en las ratas, decidimos evaluar el nivel de expresión de los genes que encontramos modificados mediante la utilización de los “macroarrays”.

En los “macroarrays” realizados en los ratones observamos que el nivel de expresión de **GLP1R** se encontraba disminuída en los animales de peso anormal al nacer (tanto alto como bajo). Al evaluar la expresión de dicho gen en las ratas adultas, observamos que la misma estaba aumentada en las hembras de alto peso al consumir dieta grasa ($p=0.03$ $n=3$ DN y 4 DG). Entre los machos, los de alto peso de dieta normal, presentaron una menor expresión de este gen con respecto al grupo normo peso ($p=0.02$ $n=5$ NP y 6 AP). La ingesta de dieta grasa provocó la disminución de la expresión entre los machos de bajo y alto peso (BP: $p=0.02$ $n=5$ DN y 4 DG; AP: $p=0.008$ $n=6$ DN y 5 DG). Entre los animales que consumieron la dieta grasa, los de peso anormal presentaron una menor expresión con respecto a los de normo peso de la misma dieta ($p=0.015$ $n=4$ BP y 11 NP vs bajo peso; y $p=0.0001$ $n=5$ AP vs alto peso)(ver Figura 17).

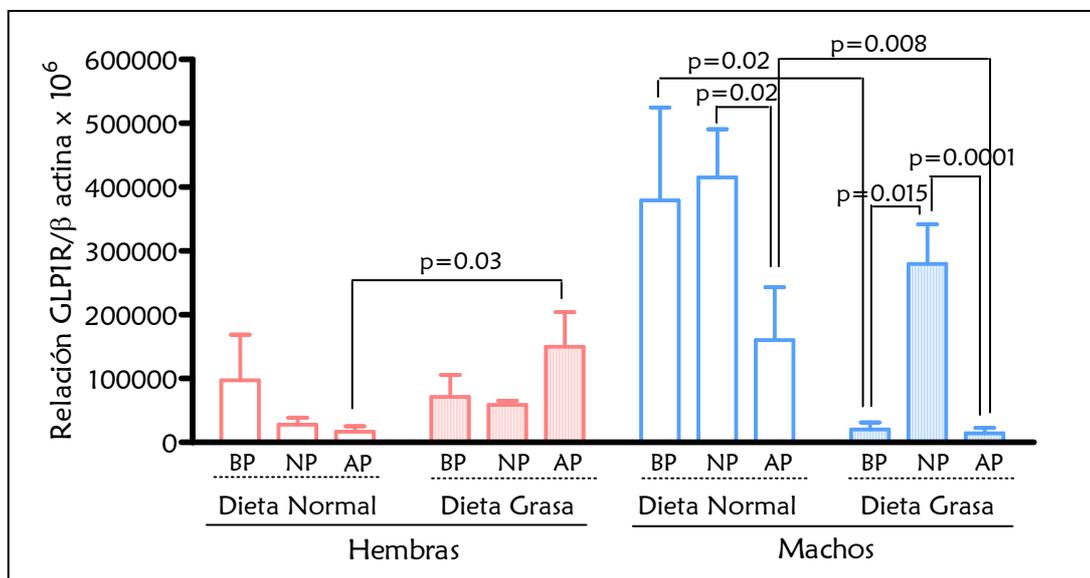


Figura 17: Niveles de expresión de GLP1R en diencefalo. Expresado como relación GLP1R/ β actina ($e^{ct \beta \text{ actina}}/e^{ct \text{ GLP1R}}$) $\times 10^6$. BP: bajo peso, NP: normo peso y AP: alto peso.

En cuanto a la expresión diencefálica del **ZFP91**, en los ratones se encontraba sobreexpresado en los animales nacidos con peso anormal (independientemente del

sexo), mientras que en las ratas adultas solo observamos diferencias en las hembras de alto peso al nacer ($p=0.04$ vs normo peso $n=7$ NP y 3 AP) y en los machos de bajo peso al nacer que presentaron menores niveles de expresión que los normo peso y los alto peso ($p=0.001$ vs NP $n=3$ BP y 7 NP y $p=0.02$ vs AP $n=6$). La ingesta de dieta grasa provocó una disminución en la expresión de este gen, afectando sólo a los machos de normo peso al nacer ($p=0.004$ $n=6$)(ver figura 18).

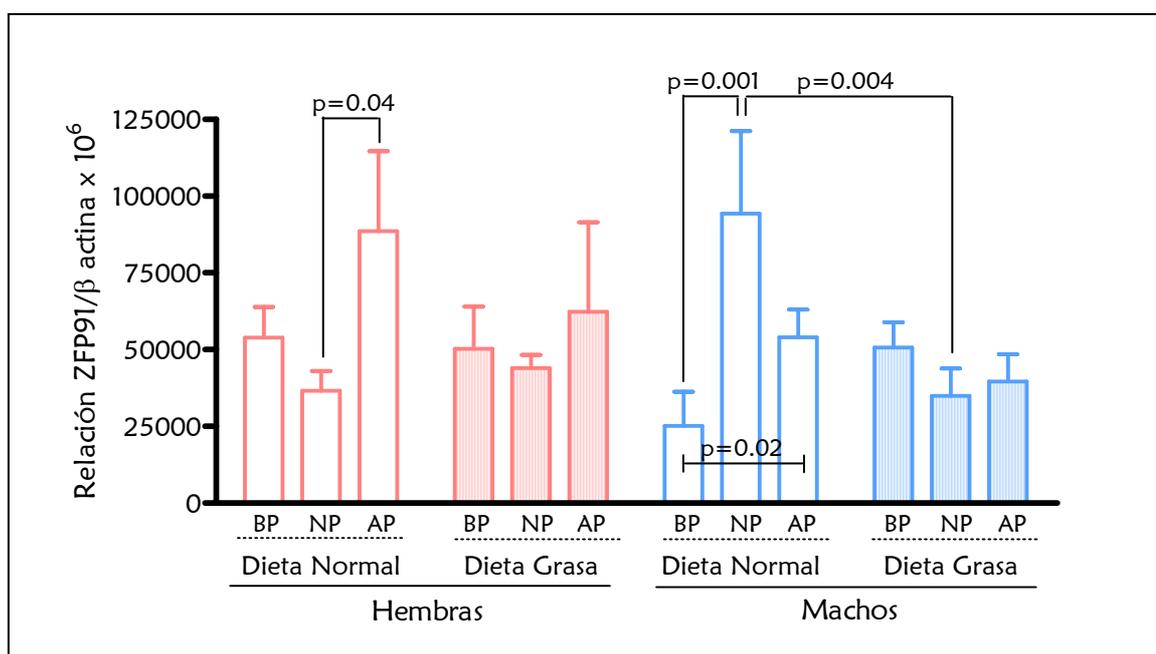


Figura 18: Niveles de expresión de ZFP91 en diencefalo. Expresado como relación ZFP91/β actina ($e^{-ct \beta \text{ actina}}/e^{-ct \text{ ZFP91}}$) $\times 10^6$. BP: bajo peso, NP: normo peso y AP: alto peso.

Al evaluar la expresión de **ADIPOR1**, encontramos que solo presentaron diferencias los machos de bajo peso que consumieron la dieta normal, que mostraron un mayor nivel de expresión comparados con los normo peso y los alto peso de la misma dieta ($p=0.03$ vs NP $n=6$ y $p=0.02$ vs AP $n=5$ y BP $n=5$). A pesar de no ser significativa la diferencia, al consumir dieta grasa el patrón de expresión de este gen entre los machos parece invertirse entre los AP y los BP (ver

figura 19).

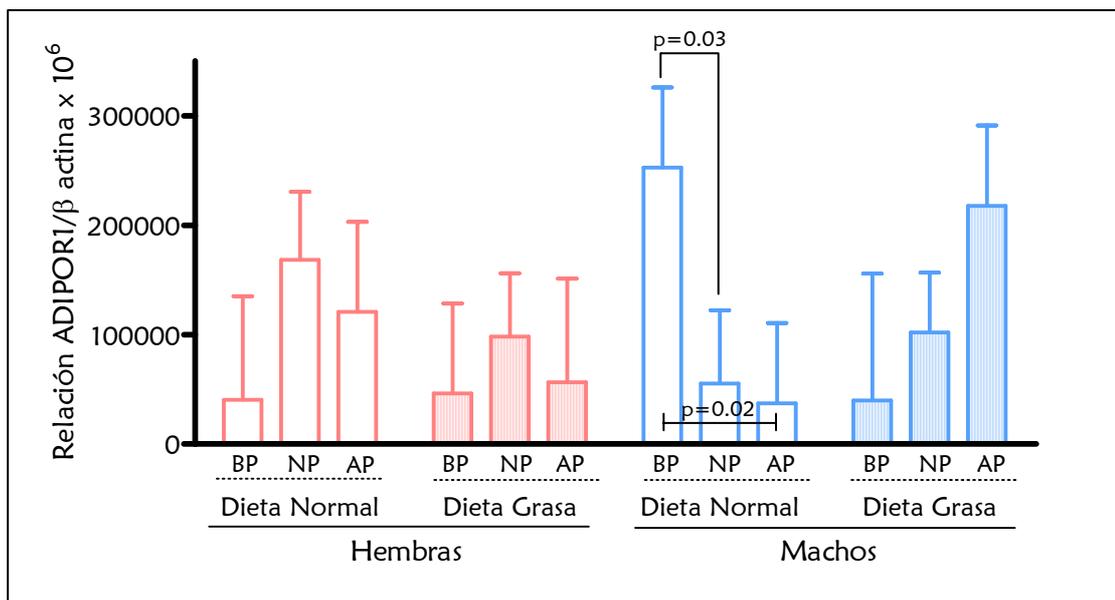


Figura 19: Niveles de expresión de ADIPOR1 en diencefalo. Expresado como relación ADIPOR1/β actina ($e^{ct \beta actina} / e^{ct ADIPOR1}$) x 10⁶. BP: bajo peso, NP: normo peso y AP: alto peso.

Por último, a pesar de haber encontrado modificada la expresión de **THRβ** en los ratones, en las ratas no encontramos ninguna diferencia significativa (ver figura 20).

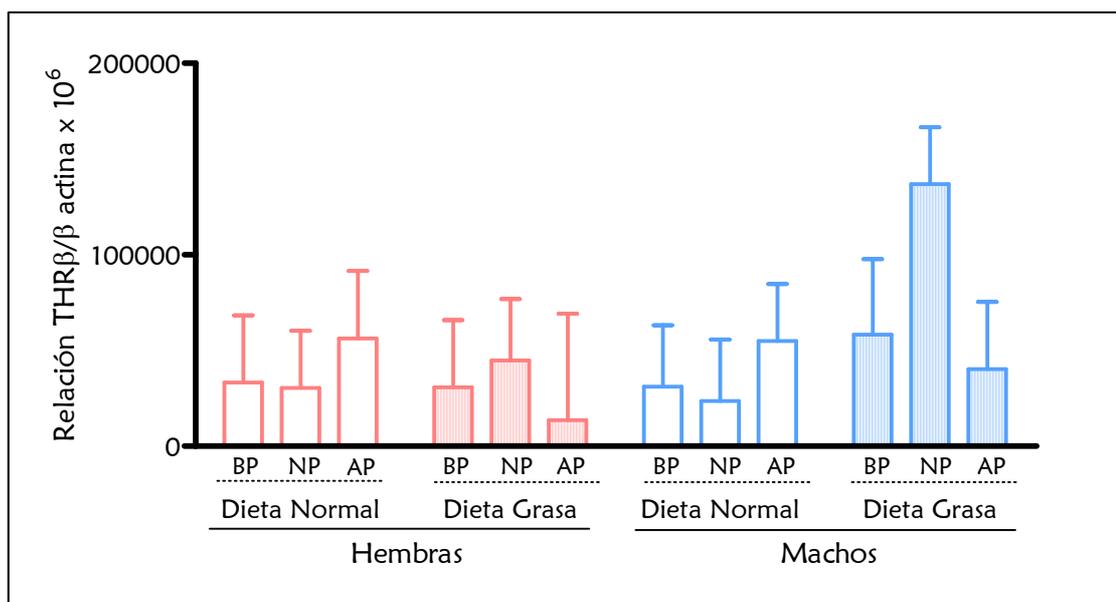


Figura 20: Niveles de expresión de THRβ en diencefalo. Expresado como relación THRβ/β actina ($e^{ct \beta actina} / e^{ct THR\beta}$) x 10⁶. BP: bajo peso, NP: normo peso y AP: alto peso.

Como encontramos que estos animales tenían diferencias en su contenido de grasa en el **hígado** según la dieta consumida, y está descrito que la esteatosis hepática se caracteriza por un incremento en la expresión de genes relacionados a la inflamación, decidimos evaluar la expresión de los genes PAI-1 y TNF- α , ambos marcadores inflamatorios asociados a la esteatosis hepática. En este caso, no encontramos diferencias en la expresión de ninguno de estos genes (datos no mostrados).

Evaluación del nivel de metilación del promotor

Para evaluar si las diferencias en la expresión observadas para GLP1R y ZFP91 se debían a un distinto nivel de metilación en el promotor de estos genes, decidimos evaluar la metilación por el método de hidrólisis del DNA con la enzima HpaII y posterior amplificación de la región de interés por Real Time PCR.

Para **GLP1R**, se puede ver en la figura 21, que encontramos diferencias significativas en el nivel de metilación de la zona estudiada entre los machos de dieta normal, los nacidos con bajo peso al nacer mostraron un menor nivel de metilación que los de normo peso ($p=0.02$ $n=6$ BP y 7 NP).

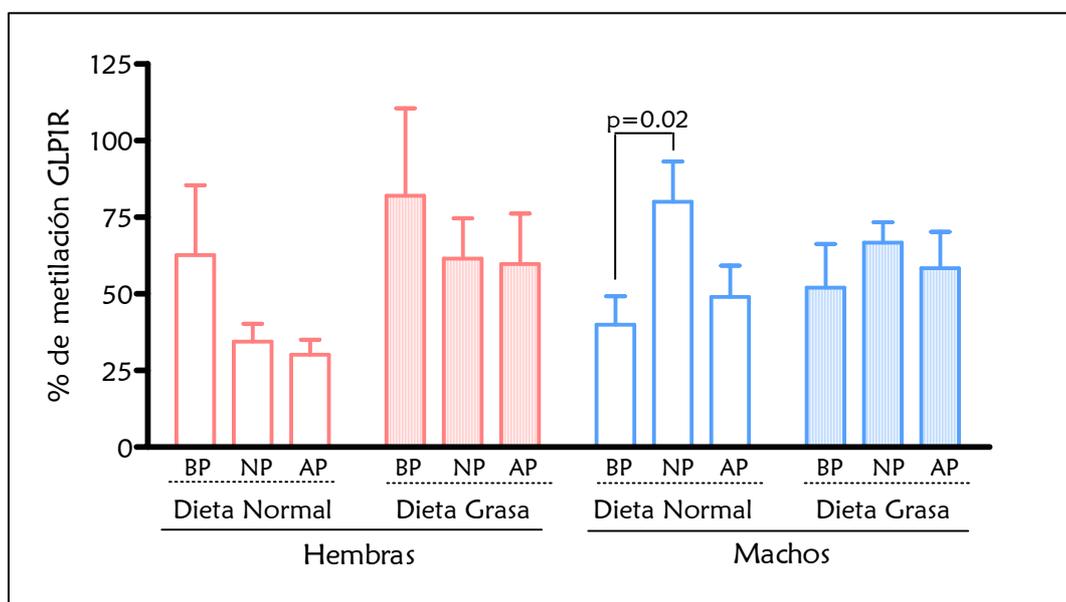


Figura 21: Nivel de metilación del promotor del gen GLP1R. BP: bajo peso, NP: normo peso y AP: alto peso.

Mientras que, para el gen **ZFP91**, en la figura 22 se observa encontramos diferencias significativas entre los machos, los de alto peso al nacer mostraron mayor nivel de metilación al ingerir dieta grasa ($p=0.04$ $n=6$ ambas dietas). Además entre los de dieta grasa, los de alto peso al nacer mostraron un nivel de metilación superior a los de bajo y normo peso (BP: $p=0.01$ $n=4$ y NP: $p=0.04$ $n=6$)

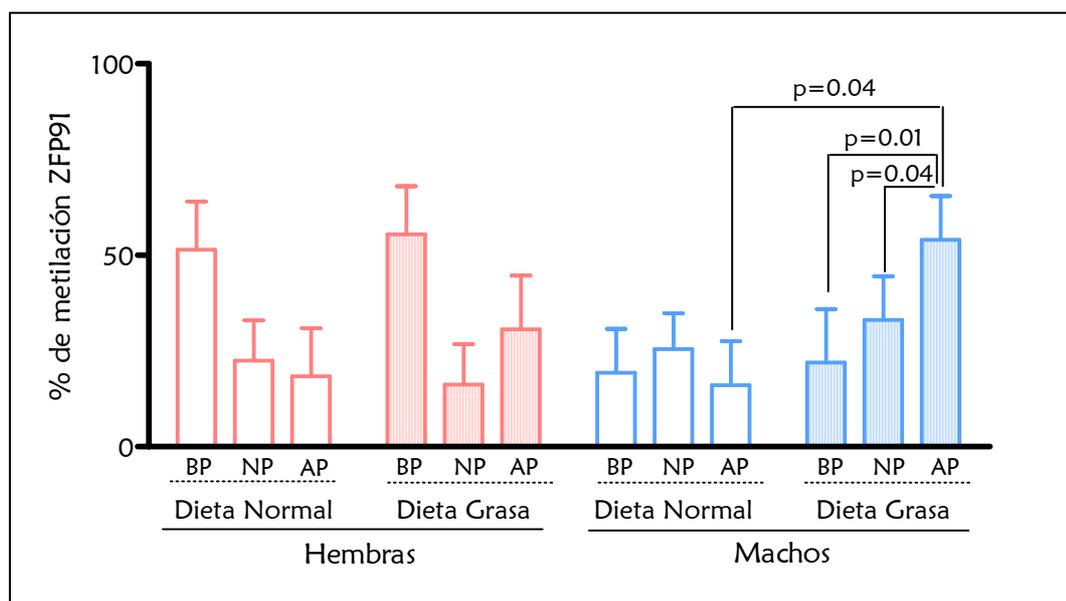


Figura 22: Nivel de metilación del promotor del gen ZFP91. BP: bajo peso, NP: normo peso y AP: alto peso.

Discusión



Debido a la pandemia de obesidad y a su estrecha relación con enfermedades como la hipertensión y la diabetes, estas tres entidades se han transformado en importantes temas de estudio e investigación en un intento de hallar la causa o causas que lo generan y encontrar una solución al problema.

En los últimos tiempos, se han estudiado los factores genéticos relacionados con la predisposición a diversas enfermedades y, más recientemente, se ha comenzado a estudiar cómo afecta el nivel de metilación de los genes a su expresión génica y cómo esta expresión estaría relacionada con el desarrollo de diversas patologías.

Por otra parte, gracias a estudios longitudinales se ha logrado encontrar asociaciones entre el peso al nacer de un individuo y la mayor susceptibilidad al desarrollo de ciertas enfermedades.

Con estos antecedentes, nos propusimos estudiar si la susceptibilidad mencionada se encuentra relacionada con la modificación en la expresión de ciertos genes candidatos, y si estos genes veían modificada su expresión a lo largo del desarrollo del individuo.

Para esto, utilizamos un modelo experimental de animales con peso anormal al nacer obtenidos mediante la restricción del crecimiento intrauterino (por medio de la disminución de la ingesta de una dieta normal o dieta rica en grasa por parte de la madre durante la gestación). Encontramos que la ingesta de dieta grasa, ya fuera *ad libitum* o restringida en un 30%, producía el nacimiento de animales de menor peso que la dieta normal (ya fuera *ad libitum* o restringida). Nuestros

resultados coinciden con los de otros grupos que obtuvieron animales con menor peso al nacer ante la restricción proteica materna [51, 166-169]. Nuestro protocolo difiere del de estos grupos debido a que ellos realizan una restricción proteica mientras que la nuestra es una restricción proteica y calórica. En cuanto al efecto de la dieta grasa, nuestros resultados coinciden con los hallados por Langley-Evans y colaboradores [159] aunque este grupo utilizó una dieta comercial con un contenido graso de un 10% (nuestra dieta grasa contiene un 40% de grasa). Por lo que parece evidente que incluso una discreta restricción proteica sería suficiente para obtener animales con bajo peso al nacer.

Al evaluar la recuperación del peso por parte de estos animales, encontramos que los nacidos con bajo peso equipararon su peso con el grupo normo peso a distintas edades; las hembras lo hicieron a los 13 días mientras que los machos recién a las 4 semanas. La recuperación del peso es evaluada, por la amplia mayoría de los autores, según la dieta ingerida por la madre y no por el peso de los animales al nacer ni por su sexo (a pesar de que no todas las crías de una madre que consumió una determinada dieta presentan las mismas características al nacer). Nuestros resultados cambian drásticamente si se evalúan de este modo, ya que se observa que hasta las 18 semanas de vida, momento en el que los animales con alimentados con distintas dietas, sólo los machos lograron alcanzar el peso de las crías de madres alimentadas con dieta normal (*ad limitum* o restringida) y esto sucede recién a las 13 semanas. En cambio, las hembras no recuperan su peso normal hasta el momento de ser separadas en las dos dietas, momento en el que la dieta pasa a ser un factor importante sobre este parámetro. En cuanto a esta recuperación del peso, algunos autores reportan que los animales

recuperaron el peso normal pero no presentaron obesidad [50, 170], entre los animales prodecentes de madres alimentadas con una dieta grasa, se ha reportado que su peso a las 12 semanas de edad no difería o era menor que el del grupo control [54, 171] aunque estos trabajos difieren del nuestro ya que mantiene a la crías bajo una dieta rica en grasa hasta el momento del destete, por lo que los animales cuando comienzan a alimentarse lo hacen bajo esta dieta, y luego son cambiados a una dieta normal. En nuestro protocolo experimental, las madres luego de parir fueron alimentadas con la dieta control, de modo que cuando los animales comienzan a alimentarse por si mismos ingieren la dieta normal y siguen bajo esta dieta hasta la semana 18 en que son separados en dos grupos. Por lo que consideramos que la ingesta de distintas dietas durante el período previo al destete, debería ser tenido en cuenta como un factor determinante en la recuperación temprana del peso corporal.

Cuando los animales son sometidos a una dieta rica en grasa, todos los grupos ganan más peso que los de dieta normal. Aunque las hembras de alto peso al nacer que ingirieron dieta grasa mostraron una mayor ganancia de peso que las normo peso de la misma dieta. Esto podría estar evidenciando una mayor susceptibilidad a la ingesta de dieta grasa por parte de las hembras de alto peso al nacer. En cuanto a este hallazgo, en la bibliografía se encuentran resultados contradictorios, hay autores que, bajo la ingesta de dieta normal, reportan una disminución en los depósitos de grasa de los animales procedentes de madres alimentadas con restricción calórica [172] y otros han reportado un incremento en los depósitos de grasa retroperitoneal y gonadal [51]. Por otra parte, otros grupos que utilizaron como protocolo la ingesta de grasa por parte de las madres,

obtuvieron que el peso corporal de las crías y el depósito de masa grasa eran mayores en los procedentes de madres alimentadas con una dieta control [52, 57].

Al evaluar la relación entre el peso del tejido adiposo y la longitud corporal de los animales, encontramos que las hembras de bajo peso al nacer alimentadas con dieta normal, presentaron una mayor relación que las de normo y alto peso de la misma dieta. Si tenemos en cuenta los dos últimos resultados (ganancia de peso y rel TA/long corporal) nos estarían indicando que las hembras de bajo peso al nacer que ingirieron dieta normal, a igual ganancia de peso, poseen un mayor contenido de tejido adiposo que las de alto y normo peso. Este mismo fenómeno se puede observar entre los machos de bajo peso al nacer alimentados con dieta grasa. Como era de esperar, todos los grupos mostraron una mayor relación tejido adiposo/longitud corporal al ingerir dieta grasa, observándose que las hembras de alto peso al nacer que ingirieron esta dieta no difirieron en este parámetro de las de bajo peso (que como se mencionó anteriormente bajo una dieta normal mostraron un mayor contenido de tejido adiposo). Entre los machos, la ingesta de dieta grasa provocó que los de bajo peso al nacer incrementaran en forma notoria su contenido de tejido adiposo (unas 4 veces) siendo éste significativamente mayor que en el grupo de normo y alto peso de la misma dieta (en estos grupos el contenido de tejido adiposo no se incremento más del doble). Esto deja en evidencia la susceptibilidad de las hembras de alto y de los machos de bajo peso a desarrollar obesidad ante la ingesta de una dieta rica en grasa.

Nuestros resultados no pueden ser comparados con los de otros grupos debido a que nuestro protocolo implicó la ingesta de dieta grasa una vez alcanzada la madurez de los animales, mientras que en la bibliografía el cambio de dieta se

realiza inmediatamente luego del destete. Y por otra parte, la utilización del parámetro TA/longitud corporal, no está difundido aunque consideramos que da una idea mucho más fiel de la obesidad del animal que el hecho de relativizar el peso del tejido adiposo al peso corporal del animal, ya que a mayor peso corporal normalmente también se dará un mayor contenido de tejido adiposo, mientras que la longitud corporal no es un parámetro tan sensible al peso del animal y solo varía con la edad del animal, por lo que la mayoría de los animales presentaron casi la misma longitud corporal lo que permite destacar la diferencia en el contenido de masa grasa.

Estrechamente relacionado con el peso corporal y el contenido de tejido adiposo, los niveles de leptina circulante fueron superiores en las hembras y machos nacidos con bajo peso (alimentados con dieta normal) y, entre las hembras, éstas fueron las únicas que no mostraron ninguna diferencia al ingerir dieta grasa. En cambio; todos los machos mostraron un mayor contenido de leptina al ingerir dieta grasa, manteniéndose la diferencia presentada por los de bajo peso al nacer.

El patrón de respuesta obtenido para la leptina fue similar al de la relación TA/long corporal, observándose también que las hembras de bajo peso que ingirieron dieta normal presentaron un mayor nivel de leptina plasmática y los machos de bajo peso que ingirieron dieta grasa presentaron un nivel de leptina mayor que los de alto peso de la misma dieta, observación que ya habíamos realizado sobre el contenido de tejido adiposo, a pesar de no haber presentado diferencias entre estos grupos al evaluar la ganancia de peso. Además entre los machos de bajo peso que ingirieron dieta grasa se obtuvo que ante una ganancia de peso similar a los otros grupos, estos animales presentaron un mayor contenido de

tejido adiposo (representado por la relación tejido adiposo/longitud corporal) lo que estuvo acompañado de un mayor nivel de leptina plasmática; lo que podría estar señalando la lógica correlación entre la cantidad de tejido adiposo y la liberación de leptina y cierto nivel de resistencia a la leptina.

Sobre todo porque, como era de esperar, obtuvimos correlaciones significativas entre la leptina y el contenido de tejido adiposo, la ganancia de peso y la relación tejido adiposo/longitud corporal.

Muy pocos trabajos han reportado los niveles de leptina plasmática en este modelo, aunque los que lo hacen reportan un incremento en este factor entre los animales que provienen de madres que sufrieron restricción alimentaria ya sea que luego sean sometidos a una dieta normal o a una dieta rica en grasas [51, 173].

Existen dos trabajos publicados [174, 175] en los que, con el fin de prevenir el desarrollo de la obesidad en la adultez, se administra leptina subcutánea durante 10 días entre el día 3 y el 13 de vida, a animales con restricción del crecimiento intrauterino. Los resultados obtenidos son muy distintos según el sexo utilizado. En el caso de las hembras, se obtuvo que el tratamiento con leptina por este breve lapso de tiempo revirtió todos los efectos observados como consecuencia de la restricción del crecimiento intrauterino [174]. En cambio, entre los machos, el tratamiento con leptina promovió la obesidad entre los animales procedentes de madres control que fueron sometidos a una dieta rica en grasa [175]. Mientras que en los animales sometidos a restricción del crecimiento intrauterino, la administración de leptina previno la obesidad “programada” sólo si estos animales fueron alimentados con una dieta normal. Cualquier efecto protector de este tratamiento fue anulado al alimentar a los animales con dieta grasa [175]. Estas

observaciones, ponen en evidencia, una vez más, las notorias diferencias entre los sexos, y la importancia de los niveles de leptina en el desarrollo y maduración de los circuitos neuronales que regulan el apetito. Sobre este tema, es sabido que la presencia de leptina durante los primeros días de vida del animal (el período comprendido entre el nacimiento y el destete) es crucial para el correcto desarrollo de las proyecciones neuronales provenientes del núcleo arcuato que regularán a las neuronas del núcleo paraventricular productoras de AgRP, α -MSH y NPY [45, 176-179].

En períodos de pobre nutrición materna, el feto desvía los nutrientes a los órganos críticos, particularmente el cerebro, en detrimento de los órganos viscerales, especialmente el páncreas y el hígado. Ésta es la explicación más ampliamente aceptada para las numerosas observaciones realizadas sobre los cambios estructurales y enzimáticos encontrados en estos órganos en el modelo de restricción del crecimiento intrauterino. Las crías de animales expuestos a distintos protocolos de restricción proteica y/o calórica, más allá de los distintos momentos de intervención en la dieta, difieren sólo levemente en su fenotipo en la adultez. Todos los protocolos utilizados parecen “programar” anormalidades en el páncreas, se cree que estos cambios en la morfología del páncreas contribuyen a incrementar la susceptibilidad a la insulino resistencia en la edad adulta. Los resultados obtenidos por los diversos grupos van desde un incremento en la glucosa plasmática [50, 54, 167, 170] hasta una disminución en la expresión del gen de la glucoquinasa [172]. Pasando por una amplia gama de resultados como una disminución de la sensibilidad a la insulina (medida mediante el test de tolerancia a la glucosa) [171, 172, 180-182], disminución en el número de islotes pancreáticos [171], disminución

en el contenido de insulina de los islotes [183], incluyendo un grupo que no encontró diferencias en la sensibilidad a la insulina [184]. Nosotros no estudiamos la histología ni la morfología del páncreas, solamente realizamos determinaciones de insulina y glucosa en el plasma de estos animales al momento del sacrificio. Con estas determinaciones realizamos el cálculo del índice de insulino resistencia, y observamos que las hembras nacidas con bajo peso que ingirieron dieta normal mostraron un índice HOMA menor que los demás grupos, y fueron las únicas hembras que incrementaron el índice al consumir dieta grasa. Entre los machos, los de alto peso al nacer tuvieron un índice HOMA menor que los demás al ingerir dieta normal, pero al contrario que las hembras, los dos grupos de peso anormal al nacer mostraron un aumento del HOMA al ingerir dieta grasa. Esto estaría indicando que los animales de peso anormal presentan una mayor predisposición al desarrollo de insulino resistencia que los demás grupos, lo que se desenmascara ante la ingesta de dieta grasa, aunque con una amplia diferencia de respuesta entre ambos sexos. Si estas diferencias son debidas a la hormonas sexuales u a otros factores merece ser estudiado en futuros experimentos.

Debido a que trabajos previos nos indicaban que la ingesta de dieta grasa provoca un incremento de la presión arterial sistólica [158, 159], y en algunos casos estaba descrito que los animales con bajo peso al nacer presentaban un incremento en su presión arterial [43, 160-162], decidimos evaluar este parámetro. No encontramos relación entre la presión arterial y el peso al nacer, y tal como había sido descrito anteriormente por nuestro grupo [158], la ingesta de dieta grasa provocó un incremento en la presión arterial de los animales, con excepción de los machos de alto peso. Otros grupos han descrito diferencias en la presión

arterial de los animales procedentes de madres que ingirieron una dieta restringida ya sea en calorías o en proteínas durante la gestación, aunque en todos los casos que encontraron estos resultados, la técnica utilizada para la determinación de la presión arterial fue la telemetría. Algunos grupos, encontraron que las hembras con restricción del crecimiento intrauterino tenían mayor presión arterial que sus controles pero no encontraron diferencias entre los machos [57], mientras que Schreuder y colaboradores, encontraron entre machos nacidos de hembras con ligamiento de las arterias uterinas, un incremento no solo en la presión arterial sistólica, sino también en la presión arterial media y en la presión de pulso [162, 185]. Actualmente, debido a la mayor difusión del método de telemetría para la medición de la presión arterial, el método plestimográfico de la cola (el utilizado por nosotros) ha recibido numerosas críticas. Por lo que nuestros hallazgos deberían ser tomados con cautela. Entre los puntos a favor de la telemetría está la posibilidad contar con medidas durante las 24 hs. del día, durante varios días, utilizando animales conscientes y con libre movimiento (mientras que en el método plestimográfico los animales son introducidos en un cepo que impide que se muevan, siendo ésta una técnica utilizada para causar stress en los animales), además la gran sensibilidad del método permite detectar diferencias tan pequeñas como 5 mmHg [186]; una importante contra de este método es que es extremadamente caro.

Como ya se mencionó, los niveles de TRH en diencéfalo (DC) se encuentran incrementados en los animales que presentan hipertensión inducida por obesidad, pero se desconoce la influencia del peso al nacer sobre esta respuesta, por lo que medimos el contenido de TRH en DC. Algunos grupos mostraron la respuesta

esperada ante la dieta grasa, por ejemplo: las hembras de normo peso incrementaron su contenido de TRH. Mientras que, las hembras de alto peso, a pesar de no mostrar diferencias significativas con las de normo peso, aumentaron su contenido de TRH al ingerir dieta grasa, difiriendo significativamente de las de bajo peso que ingirieron la misma dieta. Los machos de alto peso al nacer que ingirieron la dieta control presentaron un mayor contenido de TRH que los normo y bajo peso, aunque para nuestra sorpresa, el contenido de este grupo disminuyó al ingerir dieta grasa, por lo que se necesitarán estudios posteriores para dilucidar este punto. Sin embargo, los cambios de la TRH parecen reflejar la regulación negativa que ejercen las hormonas tiroideas en su producción y liberación [187, 188], como se discute en el apartado que sigue.

Aunque las hormonas tiroideas T_3 y T_4 se secretan a circulación, debe tenerse en cuenta que la hormona biológicamente activa es la T_3 , por lo que la T_4 debe ser convertida a T_3 en los tejidos, mediante la enzima 5´deiodinasa. Existen dos tipos de esta enzima, que son las responsables de proveer T_3 a los tejidos: la tipo I responsable de la conversión periférica de T_4 a T_3 , se expresa en hígado y riñones y la tipo II, que se expresa en la hipófisis, el sistema nervioso central, la grasa parda, la placenta y la tiroides . Dado que la 5´deiodinasa tipo II se expresa en la tiroides y se ha demostrado que juega un importante rol como fuente de T_3 plasmática [189], la relación T_3/T_4 es un parámetro que pensamos, sirve como indicador de la actividad de dicha enzima. Además se ha observado que la actividad de la tipo I disminuye en el hipotiroidismo, mientras que la tipo II aumenta su actividad al disminuir la T_4 . En cuanto a la relación T_3/T_4 , obtuvimos que tanto los machos como las hembras de bajo peso al nacer que ingirieron la dieta control mostraron

una mayor relación T_3/T_4 . Por lo tanto, entre las hembras de dieta control, las de normo peso, que mostraron un aumento en el contenido de TRH diencefálica al ingerir dieta grasa, además tuvieron una disminución en la relación T_3/T_4 . Aunque la diferencia no fue significativa, las hembras de alto peso al nacer mostraron un incremento de la TRH, bajo la ingesta de dieta grasa, que guarda relación con una también leve y no significativa, disminución en la relación T_3/T_4 . En el caso de los machos, los de alto peso al nacer, mostraron una disminución en el contenido de TRH diencefálica además de un aumento en la relación T_3/T_4 al ingerir dieta grasa. En resumen la relación T_3/T_4 explicaría, en parte ciertas anomalías observadas en el contenido de TRH en respuesta a la dieta grasa. Estudios futuros sobre este modelo deberían incluir la determinación de la actividad de la enzima 5' deiodinasa tipo II, a fin de poder dilucidar si las variaciones en la relación T_3/T_4 se corresponden efectivamente con una variación en la actividad de esta enzima. En el modelo de restricción del crecimiento intrauterino hay un solo trabajo que evalúa el nivel de hormonas tiroideas, éste fue realizado en humanos en una población de neonatos de la India, en él se midió el nivel de hormonas tiroideas y de TSH en la sangre del cordón umbilical, encontrándose la TSH aumentada y la T_4 disminuída con respecto a los neonatos normales. Además en ese trabajo se estudió la relación de las hormonas tiroideas con la sensibilidad a la insulina, obteniéndose que los neonatos con restricción del crecimiento intrauterino, también presentaban menores niveles de insulina [190].

Debido a la ya mencionada relación entre el hígado graso no alcohólico y el síndrome metabólico y, ya que esta enfermedad es considerada la manifestación hepática del síndrome metabólico, evaluamos su presencia en los animales. Los

resultados histológicos nos indicaron que existen diferencias en el nivel de esteatosis según la dieta ingerida en la adultez independientemente del peso al nacer y el sexo. Como consecuencia de estos resultados evaluamos la expresión de dos genes relacionados con la inflamación, PAI-1 y TNF- α . El inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) es una proteína de fase aguda que se induce durante un proceso inflamatorio [191]. Se ha encontrado que se expresa en los adipocitos, el hígado, los riñones y en forma abundante en el corazón [192], su síntesis es regulada por varias vías de segundos mensajeros, entre los que se encuentra TNF- α [193] (una citoquina inflamatoria). El PAI-1 está involucrado en el desarrollo de la aterosclerosis [194] y de la esteatohepatitis no alcohólica [195]. Se ha observado que su expresión se encuentra inducida en modelos de fibrosis hepática [196, 197]. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) posee múltiples funciones, afecta el metabolismo lipídico, la coagulación, la insulino resistencia y la función endotelial. Se ha observado que induce el daño hepático y la apoptosis de los hepatocitos. Sin embargo, en nuestro trabajo no encontramos diferencias significativas en la expresión de estos genes, lo que podría deberse a la ausencia de una marcada inflamación a nivel histológico.

Como consecuencia de los resultados que obtuvimos mediante la utilización de los “macroarrays”, elegimos 4 genes cuya expresión se encontró modificada en los ratones de peso anormal al nacer, independientemente del sexo.

Entre estos genes se encuentra el receptor tipo 1 de adiponectina. La adiponectina, que es sintetizada en los adipocitos, está relacionada con el riesgo

cardiovascular y la diabetes tipo 2 en la obesidad [198]. La unión de la hormona a cualquiera de sus dos tipos de receptores provoca la oxidación de ácidos grasos y el ingreso de glucosa a las células [199]. En la bibliografía se encuentra que los ratones “knock out” para el gen de ADIPOR1 presentan un incremento de la adiposidad, acompañado por una disminución en la tolerancia a la glucosa; una menor actividad locomotora y disminución en el gasto energético [200]. En nuestro modelo experimental, encontramos que los machos de bajo peso que consumieron dieta normal tenían una mayor expresión de ADIPOR1 que los normo y alto peso. Los antecedentes sobre el tema nos llevaron a suponer que, si la expresión de este gen estuviera aumentada, se encontraría disminuída la adiposidad y aumentada la tolerancia a la glucosa, la actividad locomotora y el gasto energético (al comparar a los machos de bajo peso con los de normo o alto peso); pero nosotros no encontramos estos resultados. En nuestro modelo experimental, a pesar de haber diferencias en la expresión de este gen, no las encontramos correlacionadas con los parámetros relacionados a él. Esto nos lleva a postular que estaría existiendo algún mecanismo de compensación que explique este fenómeno.

Otro de los genes estudiados fue el receptor de hormonas tiroideas (isoforma beta). Los receptores de hormonas tiroideas son factores de transcripción de localización nuclear pertenecientes a la superfamilia c-erb A, esta familia codifica para factores de transcripción modulados por ligando. Existen dos tipos de receptores α y β , a su vez cada uno posee dos isoformas 1 y 2. El $\text{THR}\beta_2$ (el estudiado por nosotros) se expresa sólo en hipotálamo e hipófisis, es el responsable de la inhibición del eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo y no puede ser reemplazado en su función por la isoforma 1 que se expresa en todos los tejidos [201]. En las

ratas, no encontramos diferencias en su expresión a pesar de los cambios ya discutidos en las hormonas tiroideas.

El péptido similar a glucagon tipo 1 es una hormona producida y secretada por las células L del intestino. Inhibe la secreción de glucagon y el vaciado gástrico. Presenta acciones superpuestas con el polipéptido inhibidor gástrico (GIP), ambos (conocidos como incretinas) potencian la secreción de insulina, actúan sobre las células β pancreáticas estimulando la secreción de insulina, estimulan vías acopladas a la proliferación de las células pancreáticas, e inhiben las asociadas a su apoptosis. La acción de GLP1 sobre las células pancreáticas no se ve afectada en la diabetes clínica o experimental, mientras que no sucede lo mismo con la acción de GIP [202]. Además ambos péptidos regulan la homeostasis de la glucosa independientemente de la secreción de insulina [202]. El receptor del péptido similar a glucagon tipo 1 (GLP1R) no tiene afinidad por péptidos similares, como el glucagon, GIP, el péptido intestinal vasoactivo (VIP) o la secretina. El promotor de GLP1R presenta sitios de unión a SP1 y SP3 [203], la actividad basal del gen es mediada por la acción de dos sitios proximales de unión a SP1, mientras que el sitio distal es el responsable de la inhibición del gen. En el año 2003, During y colaboradores [204] descubrieron que tanto GLP1 como su receptor se expresan en el cerebro, incluido el hipocampo. Experimentos con ratones “knock out” para este receptor mostraron un claro rol del gen en el aprendizaje y la neuroprotección [204]. Previamente, en 1996, otro grupo [205] había utilizado ratones “knock out” para este receptor comprobando que los animales presentaban un incremento en los niveles de glucosa luego del test de tolerancia a la glucosa junto con una disminución en los niveles de insulina y, a pesar de no haber encontrado evidencias

de una ingesta de alimento anormal ni diferencias en el peso corporal con los controles; observaron que la infusión icv de GLP1 en estos ratones no producía el mismo efecto de inhibición de la ingesta observado en los wild type [205]. Estos resultados fueron confirmados recientemente por Hansotia y colaboradores [199], pero además este grupo puso en evidencia que existe un aumento compensatorio de los niveles de GIP en los ratones “knock out” para GLP1R; lo que explica que la falta de este receptor provoque sólo modestas perturbaciones, por ejemplo, en la homeostasis de la glucosa. En nuestro trabajo hemos encontrado que la expresión de GLP1R se vió incrementada por la ingesta de dieta grasa en las hembras de alto peso al nacer y disminuía en los machos de bajo y alto peso, no encontrándose diferencias en la expresión de los grupos de normo peso. Teniendo en cuenta los estudios realizados por otros grupos sobre GLP1R, podríamos especular que la disminución de la expresión del gen en los machos de peso anormal bajo la ingesta de dieta grasa podría resultar en una leve intolerancia a la glucosa y un aumento de los niveles de insulina (luego del test de tolerancia a la glucosa). En nuestro modelo no realizamos un test de tolerancia a la glucosa, pero observamos que estos animales presentaron un índice HOMA superior al ingerir dieta grasa. Mientras que el incremento en la expresión de GLP1R entre las hembras de alto peso alimentadas con dieta grasa, nos llevaría a esperar una falta de respuesta a un test de tolerancia a la glucosa; este incremento en la expresión podría explicar porque la ingesta de dieta grasa no provocó en este grupo alteración alguna en el índice HOMA. Estos resultados, aunque deben ser confirmados, sugieren por primera vez que la ingesta de dieta grasa puede modular la vía de señalización de GLP1 y consecuentemente producir un mecanismo compensatorio ya que los doble “knock out” para los

receptores de incretinas son resistentes a la ganancia de peso frente al consumo de dieta grasa [202].

Debido a las diferencias halladas en la expresión de este gen, evaluamos el nivel de metilación de su promotor, para lo que utilizamos la técnica consistente en la digestión del DNA con una enzima sensible a metilación (Hpa II) esta enzima reconoce las secuencias CCGG pero es capaz de hidrolizar la unión fosfodiéster únicamente cuando la secuencia no se encuentra metilada. Luego el DNA tratado (y sin tratar) fue evaluado por medio de PCR en tiempo real. Si la secuencia se encontraba metilada la enzima no será capaz de cortar por lo que la relación entre el DNA tratado con la enzima y el sin tratar será de 1, mientras que si la enzima hidroliza el DNA (o sea que la secuencia no estaba metilada) esta relación será <1 . En la zona amplificada por los primers elegidos se unen tres factores de transcripción: NF- κ B, c-Myc y AP-2 α (según la predicción in silico del programa alibaba2: <http://www.gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/>). Encontramos que sólo los machos de bajo peso al nacer presentaron un mayor nivel de metilación de esta zona que los de normo peso. Aunque no se pudo demostrar que guarda relación con los niveles de expresión del gen.

Por último, evaluamos la expresión de la proteína dedos de zinc 91 (que se ubica en el núcleo). Contiene dominios C2H2, que son clásicos dominios dedos de zinc presentes en numerosas proteínas que se unen a ácidos nucleicos. El homólogo humano del gen muestra su expresión aumentada en la leucemia mieloide aguda, en la que podría actuar como un factor de transcripción involucrado en la proliferación o en acciones antiapoptóticas. En la rata, la proteína tiene 568

aminoácidos. Ni la proteína ni el gen que la codifica se encuentran muy estudiados. En nuestro modelo, encontramos que la expresión del ZFP91 se encontraba aumentada en las hembras de alto peso al nacer y disminuía en los machos de bajo peso, cuando éstos fueron alimentados con dieta normal, ante la ingesta de dieta grasa el nivel de expresión del gen en los machos normo peso disminuyó significativamente. Debido a las diferencias halladas en la expresión de este gen, decidimos evaluar el nivel de metilación de su promotor, para lo que utilizamos la misma técnica mencionada para el estudio de la metilación del promotor de GLP1R. Encontramos diferencias entre los machos de alto peso que presentaron disminución en la metilación al ingerir dieta grasa. Además entre los machos que consumieron dieta grasa, los de bajo y normo peso tenían esta zona del gen más metilada que los de alto peso. Como ya se mencionó en la introducción, se ha demostrado recientemente mediante el uso de una dieta que incrementa el metabolismo de los donantes de grupos metilo, como los nutrientes influyen sobre los factores epigenéticos, llevando a un incremento en la metilación de determinados genes [72]. Por lo que, haciendo una analogía con estas observaciones, podríamos especular con que la ingesta de dieta grasa provoca una menor disponibilidad de donantes de grupos metilo (por reemplazar en un 40% los componentes importantes que contienen la vitamina B12 o el ácido fólico) lo que lleva a un menor nivel de metilación en determinados genes, entre los que se encontraría el promotor de GLP1R. Según el programa alibaba2, en la zona del promotor estudiada se unen el receptor de glucocorticoides (GR), el factor distal alcohol deshidrogenasa (ADF-1) y la proteína de unión alfa al CAATT/enhancer (C/EBP- α). Este último factor de transcripción está fuertemente asociado con el

síndrome metabólico y enfermedades relacionadas. La actividad transcripcional de C/EBP- α es crítica para el establecimiento y el mantenimiento de la homeostasis energética en los neonatos [206] y se encuentra involucrado en la regulación de los genes cuyos productos son necesarios para el metabolismo energético y la diferenciación de los adipocitos [207]. Dado el poco conocimiento disponible sobre este gen, es difícil encontrar alguna relación entre su nivel de expresión y el síndrome metabólico. Si se tiene en cuenta que las evidencias indican que se encuentra regulado por un factor de transcripción relacionado con el metabolismo energético (C/EBP- α), podríamos suponer que este gen se encuentra directa o indirectamente involucrado en esta acción, tan determinante a la hora de desarrollar obesidad. En nuestro trabajo no encontramos evidencias de la existencia de una relación entre el nivel de expresión del gen y la metilación del mismo en la zona estudiada.

El no haber encontrado resultados similares a los obtenidos en los estudios preliminares realizados por “macroarrays” en ratones de 1 día nos lleva a proponer que estas diferencias pueden deberse a que realizamos el estudio en distintas etapas del desarrollo. Tal vez hubiera sido conveniente realizar la misma evaluación a distintos tiempos en el desarrollo de las ratas, aunque esto hubiera implicado una cantidad de animales imposible de manejar y de alojar.

Por otra parte, el hecho de no haber encontrado relación entre el nivel de expresión y el de metilación de estos genes nos indica que la regulación de su expresión se debería a mecanismos diferentes a la metilación del promotor. Otros potenciales factores que deberían ser estudiados podrían ser la acetilación y

desacetilación o la metilación y desmetilación de histonas. Por otra parte, como nosotros estudiamos una zona pequeña del promotor podría suceder que la regulación por metilación del promotor ocurra en sitios regulatorios más lejanos a la zona que nosotros hemos estudiado. Por lo tanto, estos resultados no descartan completamente la regulación de la expresión de estos genes por metilación.

CONCLUSIONES

La utilización de un modelo experimental de restricción del crecimiento intrauterino mediante la restricción proteica y calórica permite reproducir un modelo de bajo peso al nacer el cual resulta de utilidad para estudiar el desarrollo de enfermedades relacionadas con dicho fenotipo.

La administración de una dieta rica en grasa permite desenmascarar algunas de las características de este modelo. Además, los distintos resultados obtenidos entre los sexos muestran una vez más la amplia disparidad entre ambos, no solo ante la ingesta de la dieta grasa sino también ante un mismo insulto sufrido durante el desarrollo prenatal, lo que sugiere que el dimorfismo sexual ante estas enfermedades debe ser estudiado con mayor profundidad.

A pesar de haber encontrado en forma inesperada que los niveles de TRH diencefálicos no se correspondían con la presión arterial de los animales, creemos que esta disociación se debe a una alteración del eje tiroideo debida a una diferencia en la conversión de T_4 a T_3 a nivel tisular; especialmente en los animales con peso anormal al nacer lo que conlleva a una respuesta alterada a la dieta grasa en la adultez. Esta hipótesis merece ser estudiada en más detalle en futuros experimentos.

Este es el primer trabajo en el que se estudia la expresión génica de *glp1r* y de *zfp91* y su nivel de metilación en diencefalo. Además es uno de los pocos trabajos en los que se evalúa como afecta el peso al nacer a la expresión génica y la metilación.

Con el fin de poder resumir en forma clara los resultados aquí mostrados, en las siguientes tablas se pueden observar los parámetros medidos en los animales. En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos entre los animales que ingirieron dieta normal. Mientras que en la tabla 2, se observan los resultados obtenidos cuando los animales ingirieron dieta grasa. De este modo en la tabla 2 se hace evidente la mayor susceptibilidad de los animales a determinadas patologías desenmascaradas por la ingesta de dieta grasa y en ambas el claro dimorfismo sexual al cual aludimos anteriormente.

| Parámetro | Hembras | | Machos | |
|----------------------------------|------------------------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| | Bajo Peso | Alto Peso | Bajo Peso | Alto Peso |
| Peso al destete | = | ↑↑↑↑ ^(*●) | ↓↓ ^(●) | ↑↑ ^(*●) |
| Peso al inicio de la dieta | = | ↑↑↑ ^(*●) | = | = |
| Ganancia de Peso por la dieta | = | = | = | ↓ |
| Rel. Tej. Adiposo/long. corporal | ↑ ^(●#) | = | = | = |
| Leptina plasmática | ↑↑ ^(●#) | = | ↑ | ↓↓ ^(*) |
| HOMA | ↓↓ ^(●#) | = | ↑ | ↓↓↓ ^(●#) |
| Presión Arterial Sistólica | ↓ | = | ↓ | = |
| TRH diencefálica | ↑ | ↑ | ↓ | ↑↑↑↑ ^(*●) |
| Hormonas Tiroideas | T ₃ | ↑ | ↑ | ↑ |
| | T ₄ | ↓↓ ^(●) | ↓ ^(●) | ↓↓ ^(●) |
| | Rel T ₃ /T ₄ | ↑↑ ^(●) | ↑ | ↑ ^(●#) |
| Expresión GLP1R | ↑ | = | = | ↓↓ ^(#) |
| Expresión ZFP91 | ↓ | ↑↑↑ ^(●) | ↓↓↓ ^(#●) | ↓↓ |
| Expresión ADIPOR1 | ↑↑ | ↓ | ↑↑↑ ^(●#) | = |
| Expresión THRβ | = | ↑ | = | ↑ |
| Metilación GLP1R | ↑ | = | ↓ ^(●) | ↓ |
| Metilación ZFP91 | ↑↑ | = | ↓ | ↓ |

Tabla 1: Resultados obtenidos entre los animales sometidos a dieta normal. Las flechas indican si el valor fue menor (↓) o mayor (↑) que el grupo normo peso de la misma dieta. #: diferencias significativas respecto al grupo alto peso misma dieta; *: diferencias significativas respecto bajo peso misma dieta y ●: diferencias significativas respecto normo peso misma dieta.

| Parámetro | Hembras | | | Machos | | |
|----------------------------------|------------------------------------|------------|-----------|-----------|------------|-----------|
| | Bajo Peso | Normo Peso | Alto Peso | Bajo Peso | Normo Peso | Alto Peso |
| Ganancia de Peso por la dieta | ↑↑↑(δ) | ↑↑(δ) | ↑↑↑↑(δ●) | ↑↑(δ) | ↑(δ) | ↑(δ) |
| Rel. Tej. Adiposo/long. corporal | ↑↑(δ●) | ↑↑(δ) | ↑↑↑↑(δ●) | ↑↑↑↑(δ#●) | ↑↑(δ) | ↑(δ) |
| Leptina plasmática | ↑ | ↑(δ) | ↑↑(δ) | ↑↑↑↑(δ#) | ↑↑↑↑(δ) | ↑↑(δ) |
| HOMA | ↑↑↑↑(δ) | ↑ | ↑↑ | ↑↑↑↑(δ#●) | = | ↑↑↑↑(δ) |
| Presión Arterial Sistólica | ↑(δ) | ↑(δ) | ↑(δ) | ↑(δ) | ↑(δ) | = |
| TRH diencefálica | ↓↓(●#) | ↑↑↑↑ | ↑↑ | = | = | ↓↓↓↓(δ) |
| Hormonas Tiroideas | T ₃ | ↑↑ | ↓ | ↓↓ | ↑↑↑↑(δ) | ↑↑↑↑(δ) |
| | T ₄ | ↑ | ↑ | ↑↑ | ↓↓↓(δ) | ↓↓ |
| | Rel T ₃ /T ₄ | ↑ | ↓ | ↓ | ↑↑ | ↑↑↑↑(δ) |
| Expresión GLPIR | ↓ | ↑ | ↑↑(δ) | ↓↓↓↓(δ) | ↓↓(*) | ↓↓(δ) |
| Expresión ZFP91 | = | = | ↓ | ↑↑ | ↓↓↓↓(δ) | ↓ |
| Expresión ADIPOR1 | = | ↓ | ↓ | ↓↓↓ | ↑ | ↑↑↑ |
| Expresión THRβ | = | ↑ | ↓↓ | ↑↑ | ↑↑↑↑ | ↓ |
| Metilación GLPIR | ↑↑ | ↑↑ | ↑↑ | ↑ | ↓ | ↓ |
| Metilación ZFP91 | = | = | ↑ | = | ↑ | ↑↑↑↑(δ●*) |

Tabla 2: Resultados obtenidos entre los animales sometidos a dieta grasa. Las flechas indican si el valor fue menor (↓) o mayor (↑) que el mismo grupo de peso al nacer sometido a dieta normal. &: diferencias significativas con respecto al mismo grupo de peso alimentado con dieta normal; #: diferencias significativas respecto al grupo alto peso (dieta grasa); *: diferencias significativas respecto al grupo bajo peso (dieta grasa) y ●: diferencias significativas respecto al grupo normo peso (dieta grasa)

BIBLIOGRAFIA

1. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; **37**(12):1595-1607.
2. Executive Summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285:2486-97. 2001.
3. Grundy SM, Brewer HB, Jr., Cleeman JI, Smith SC, Jr., Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 2004; **109**(3):433-438.
4. Ford ES, Mokdad AH, Giles WH, Brown DW. The metabolic syndrome and antioxidant concentrations: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes* 2003; **52**(9):2346-2352.
5. Arch JR, Stock MJ, Trayhurn P. Leptin resistance in obese humans: does it exist and what does it mean? *Int J Obes Relat Metab Disord* 1998; **22**(12):1159-1163.
6. Bonora E, Kiechl S, Willeit J, Oberhollenzer F, Egger G, Bonadonna RC, et al. Metabolic syndrome: epidemiology and more extensive phenotypic description. Cross-sectional data from the Bruneck Study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; **27**(10):1283-1289.
7. Reaven G. The metabolic syndrome or the insulin resistance syndrome? Different names, different concepts, and different goals. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2004; **33**(2):283-303.
8. Angelico F, Del BM, Conti R, Francioso S, Feole K, Fiorello S, et al. Insulin resistance, the metabolic syndrome, and nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; **90**(3):1578-1582.
9. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001; **50**(8):1844-1850.

10. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 2003; **37**(4):917-923.
11. Wilson PW, Grundy SM. The metabolic syndrome: practical guide to origins and treatment: Part I. *Circulation* 2003; **108**(12):1422-1424.
12. Balkau B, Charles MA, Drivsholm T, Borch-Johnsen K, Wareham N, Yudkin JS, et al. Frequency of the WHO metabolic syndrome in European cohorts, and an alternative definition of an insulin resistance syndrome. *Diabetes Metab* 2002; **28**(5):364-376.
13. Luquez Hugo A. Síndrome metabólico: las definiciones actuales y la realidad argentina. 34 [Rev Fed Arg Cardiol], 195-201. 2005.
14. <http://www.texasheart.org/>. 2007.
15. World Health Organization. Commission on Macroeconomics and Health. Macroeconomics and health: investing in health for economic development. 2001.
16. Primera Encuesta Nacional de Factores de Riesgo. 2003.
17. Porto PI, Garcia SI, Dieuzeide G, Gonzalez C, Landa MS, Pirola CJ. Clinical features of the metabolic syndrome in adolescents: minor role of the Trp64Arg beta3-adrenergic receptor gene variant. *Pediatr Res* 2004; **55**(5):836-841.
18. Narkiewicz K. Obesity and hypertension--the issue is more complex than we thought. *Nephrol Dial Transplant* 2006; **21**(2):264-267.
19. Krauss RM, Winston M, Fletcher RN, Grundy SM. Obesity: impact of cardiovascular disease. *Circulation* 1998; **98**(14):1472-1476.
20. Cassidy AE, Bielak LF, Zhou Y, Sheedy PF, Turner ST, Breen JF, et al. Progression of subclinical coronary atherosclerosis: does obesity make a difference? *Circulation* 2005; **111**(15):1877-1882.
21. Engeli S, Sharma AM. Role of adipose tissue for cardiovascular-renal regulation in health and disease. *Horm Metab Res* 2000; **32**(11-12):485-499.

22. Montani JP, Antic V, Yang Z, Dulloo A. Pathways from obesity to hypertension: from the perspective of a vicious triangle. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002; **26 Suppl 2**:S28-S38.
23. Julius S, Valentini M, Palatini P. Overweight and hypertension : a 2-way street? *Hypertension* 2000; **35**(3):807-813.
24. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980; **55**(7):434-438.
25. Portincasa P, Grattagliano I, Palmieri VO, Palasciano G. The emerging problem of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Rom J Gastroenterol* 2005; **14**(1):43-51.
26. Bogdanova K, Pocztakova H, Uherkova L, Riegrova D, Rypka M, Feher J, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)--a novel common aspect of the metabolic syndrome. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2006; **150**(1):101-104.
27. Rector RS, Thyfault JP, Wei Y, Ibdah JA. Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: An update. *World J Gastroenterol* 2008; **14**(2):185-192.
28. Ryysy L, Hakkinen AM, Goto T, Vehkavaara S, Westerbacka J, Halavaara J, et al. Hepatic fat content and insulin action on free fatty acids and glucose metabolism rather than insulin absorption are associated with insulin requirements during insulin therapy in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2000; **49**(5):749-758.
29. Barker DJ, Martyn CN, Osmond C, Hales CN, Fall CH. Growth in utero and serum cholesterol concentrations in adult life. *BMJ* 1993; **307**(6918):1524-1527.
30. Barker DJ. Fetal nutrition and cardiovascular disease in later life. *Br Med Bull* 1997; **53**(1):96-108.
31. Lucas A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp* 1991; **156**:38-50.

32. Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 1992; **35**(7):595-601.
33. Fernandez-Twinn DS, Ozanne SE. Mechanisms by which poor early growth programs type-2 diabetes, obesity and the metabolic syndrome. *Physiol Behav* 2006; **88**(3):234-243.
34. Gluckman PD, Hanson MA. The developmental origins of the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab* 2004; **15**(4):183-187.
35. Barker DJ, Bull AR, Osmond C, Simmonds SJ. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *BMJ* 1990; **301**(6746):259-262.
36. Phillips DI, Barker DJ, Hales CN, Hirst S, Osmond C. Thinness at birth and insulin resistance in adult life. *Diabetologia* 1994; **37**(2):150-154.
37. Martyn CN, Barker DJ, Jaspersen S, Greenwald S, Osmond C, Berry C. Growth in utero, adult blood pressure, and arterial compliance. *Br Heart J* 1995; **73**(2):116-121.
38. Eriksson JG, Forsen T, Tuomilehto J, Winter PD, Osmond C, Barker DJ. Catch-up growth in childhood and death from coronary heart disease: longitudinal study. *BMJ* 1999; **318**(7181):427-431.
39. Ostlund I, Haglund B, Hanson U. Gestational diabetes and preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; **113**(1):12-16.
40. Armitage JA, Taylor PD, Poston L. Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy rich diet during development. *J Physiol* 2005; **565**(Pt 1):3-8.
41. Campbell DM, Hall MH, Barker DJ, Cross J, Shiell AW, Godfrey KM. Diet in pregnancy and the offspring's blood pressure 40 years later. *Br J Obstet Gynaecol* 1996; **103**(3):273-280.
42. Shiell AW, Campbell DM, Hall MH, Barker DJ. Diet in late pregnancy and glucose-insulin metabolism of the offspring 40 years later. *BJOG* 2000; **107**(7):890-895.

43. Langley-Evans SC. Intrauterine programming of hypertension in the rat: nutrient interactions. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 1996; **114**(4):327-333.
44. Armitage JA, Khan IY, Taylor PD, Nathanielsz PW, Poston L. Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: how strong is the evidence from experimental models in mammals? *J Physiol* 2004; **561**(Pt 2):355-377.
45. Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB. Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science* 2004; **304**(5667):108-110.
46. Muhlhausler BS, Adam CL, Findlay PA, Duffield JA, McMillen IC. Increased maternal nutrition alters development of the appetite-regulating network in the brain. *FASEB J* 2006; **20**(8):1257-1259.
47. Ravelli AC, van der Meulen JH, Michels RP, Osmond C, Barker DJ, Hales CN, et al. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet* 1998; **351**(9097):173-177.
48. Ravelli AC, van der Meulen JH, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP. Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *Am J Clin Nutr* 1999; **70**(5):811-816.
49. 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.
50. Ozaki T, Nishina H, Hanson MA, Poston L. Dietary restriction in pregnant rats causes gender-related hypertension and vascular dysfunction in offspring. *J Physiol* 2001; **530**(Pt 1):141-152.
51. Vickers MH, Reddy S, Ikenasio BA, Breier BH. Dysregulation of the adipoinular axis -- a mechanism for the pathogenesis of hyperleptinemia and adipogenic diabetes induced by fetal programming. *J Endocrinol* 2001; **170**(2):323-332.
52. Guo F, Jen KL. High-fat feeding during pregnancy and lactation affects offspring metabolism in rats. *Physiol Behav* 1995; **57**(4):681-686.
53. Taylor PD, McConnell J, Khan IY, Holemans K, Lawrence KM, sare-Anane H, et al. Impaired glucose homeostasis and mitochondrial abnormalities in

- offspring of rats fed a fat-rich diet in pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; **288**(1):R134-R139.
54. Khan IY, Taylor PD, Dekou V, Seed PT, Lakasing L, Graham D, et al. Gender-linked hypertension in offspring of lard-fed pregnant rats. *Hypertension* 2003; **41**(1):168-175.
 55. Khan IY, Dekou V, Douglas G, Jensen R, Hanson MA, Poston L, et al. A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; **288**(1):R127-R133.
 56. Palinski W, D'Armiento FP, Witztum JL, de NF, Casanada F, Condorelli M, et al. Maternal hypercholesterolemia and treatment during pregnancy influence the long-term progression of atherosclerosis in offspring of rabbits. *Circ Res* 2001; **89**(11):991-996.
 57. Khan I, Dekou V, Hanson M, Poston L, Taylor P. Predictive adaptive responses to maternal high-fat diet prevent endothelial dysfunction but not hypertension in adult rat offspring. *Circulation* 2004; **110**(9):1097-1102.
 58. Taylor PD, Khan IY, Hanson MA, Poston L. Impaired EDHF-mediated vasodilatation in adult offspring of rats exposed to a fat-rich diet in pregnancy. *J Physiol* 2004; **558**(Pt 3):943-951.
 59. Plagemann A, Harder T, Rake A, Janert U, Melchior K, Rohde W, et al. Morphological alterations of hypothalamic nuclei due to intrahypothalamic hyperinsulinism in newborn rats. *Int J Dev Neurosci* 1999; **17**(1):37-44.
 60. Levin BE. The obesity epidemic: metabolic imprinting on genetically susceptible neural circuits. *Obes Res* 2000; **8**(4):342-347.
 61. de Boo HA, Harding JE. The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2006; **46**(1):4-14.
 62. Feil R. Environmental and nutritional effects on the epigenetic regulation of genes. *Mutat Res* 2006; **600**(1-2):46-57.
 63. Cutfield WS, Hofman PL, Mitchell M, Morison IM. Could epigenetics play a role in the developmental origins of health and disease?. *Pediatr Res* 2007; **61**(5 Pt 2):68R-75R.

64. Toniolo D, D'Urso M, Martini G, Persico M, Tufano V, Battistuzzi G, et al. Specific methylation pattern at the 3' end of the human housekeeping gene for glucose 6-phosphate dehydrogenase. *EMBO J* 1984; **3**(9):1987-1995.
65. Battistuzzi G, D'Urso M, Toniolo D, Persico GM, Luzzatto L. Tissue-specific levels of human glucose-6-phosphate dehydrogenase correlate with methylation of specific sites at the 3' end of the gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; **82**(5):1465-1469.
66. Benvenisty N, Mencher D, Meyuhas O, Razin A, Reshef L. Sequential changes in DNA methylation patterns of the rat phosphoenolpyruvate carboxykinase gene during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; **82**(2):267-271.
67. Monk M. Epigenetic programming of differential gene expression in development and evolution. *Dev Genet* 1995; **17**(3):188-197.
68. Eden S, Cedar H. Role of DNA methylation in the regulation of transcription. *Curr Opin Genet Dev* 1994; **4**(2):255-259.
69. Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 1992; **69**(6):915-926.
70. Waterland RA, Garza C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am J Clin Nutr* 1999; **69**(2):179-197.
71. Vickaryous N, Whitelaw E. The role of early embryonic environment on epigenotype and phenotype. *Reprod Fertil Dev* 2005; **17**(3):335-340.
72. Cooney CA, Dave AA, Wolff GL. Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring. *J Nutr* 2002; **132**(8 Suppl):2393S-2400S.
73. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; **372**(6505):425-432.
74. Christou H, Serdy S, Mantzoros CS. Leptin in relation to growth and developmental processes in the fetus. *Semin Reprod Med* 2002; **20**(2):123-130.

75. Shutter JR, Graham M, Kinsey AC, Scully S, Luthy R, Stark KL. Hypothalamic expression of ART, a novel gene related to agouti, is up-regulated in obese and diabetic mutant mice. *Genes Dev* 1997; **11**(5):593-602.
76. Friedman JM. Modern science versus the stigma of obesity. *Nat Med* 2004; **10**(6):563-569.
77. Alexe DM, Syridou G, Petridou ET. Determinants of early life leptin levels and later life degenerative outcomes. *Clin Med Res* 2006; **4**(4):326-335.
78. Grove KL, Smith MS. Ontogeny of the hypothalamic neuropeptide Y system. *Physiol Behav* 2003; **79**(1):47-63.
79. Plagemann A, Harder T, Rake A, Waas T, Melchior K, Ziska T, et al. Observations on the orexigenic hypothalamic neuropeptide Y-system in neonatally overfed weanling rats. *J Neuroendocrinol* 1999; **11**(7):541-546.
80. Koutcherov Y, Mai JK, Paxinos G. Hypothalamus of the human fetus. *J Chem Neuroanat* 2003; **26**(4):253-270.
81. El-Haddad MA, Desai M, Gayle D, Ross MG. In utero development of fetal thirst and appetite: potential for programming. *J Soc Gynecol Investig* 2004; **11**(3):123-130.
82. Roberts TJ, Nijland MJ, Caston-Balderrama A, Ross MG. Central leptin stimulates ingestive behavior and urine flow in the near term ovine fetus. *Horm Metab Res* 2001; **33**(3):144-150.
83. McMillen IC, Muhlhausler BS, Duffield JA, Yuen BS. Prenatal programming of postnatal obesity: fetal nutrition and the regulation of leptin synthesis and secretion before birth. *Proc Nutr Soc* 2004; **63**(3):405-412.
84. Ben X, Qin Y, Wu S, Zhang W, Cai W. Placental leptin correlates with intrauterine fetal growth and development. *Chin Med J (Engl)* 2001; **114**(6):636-639.
85. Gross GA, Solenberger T, Philpott T, Holcomb WL, Jr., Landt M. Plasma leptin concentrations in newborns of diabetic and nondiabetic mothers. *Am J Perinatol* 1998; **15**(4):243-247.

86. Martin-Gronert MS, Ozanne SE. Programming of appetite and type 2 diabetes. *Early Hum Dev* 2005; **81**(12):981-988.
87. Persson B, Westgren M, Celsi G, Nord E, Ortqvist E. Leptin concentrations in cord blood in normal newborn infants and offspring of diabetic mothers. *Horm Metab Res* 1999; **31**(8):467-471.
88. Javaid MK, Godfrey KM, Taylor P, Robinson SM, Crozier SR, Dennison EM, et al. Umbilical cord leptin predicts neonatal bone mass. *Calcif Tissue Int* 2005; **76**(5):341-347.
89. Yarbrough DE, Barrett-Connor E, Kritz-Silverstein D, Wingard DL. Birth weight, adult weight, and girth as predictors of the metabolic syndrome in postmenopausal women: the Rancho Bernardo Study. *Diabetes Care* 1998; **21**(10):1652-1658.
90. Meier U, Gressner AM. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin Chem* 2004; **50**(9):1511-1525.
91. Mostyn A, Keisler DH, Webb R, Stephenson T, Symonds ME. The role of leptin in the transition from fetus to neonate. *Proc Nutr Soc* 2001; **60**(2):187-194.
92. Casanueva FF, Dieguez C. Neuroendocrine regulation and actions of leptin. *Front Neuroendocrinol* 1999; **20**(4):317-363.
93. Chan JL, Mantzoros CS. Role of leptin in energy-deprivation states: normal human physiology and clinical implications for hypothalamic amenorrhoea and anorexia nervosa. *Lancet* 2005; **366**(9479):74-85.
94. Licinio J, Negrao AB, Mantzoros C, Kaklamani V, Wong ML, Bongiorno PB, et al. Synchronicity of frequently sampled, 24-h concentrations of circulating leptin, luteinizing hormone, and estradiol in healthy women. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**(5):2541-2546.
95. Baldelli R, Dieguez C, Casanueva FF. The role of leptin in reproduction: experimental and clinical aspects. *Ann Med* 2002; **34**(1):5-18.
96. Cunningham MJ, Clifton DK, Steiner RA. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biol Reprod* 1999; **60**(2):216-222.

97. Mantzoros CS, Flier JS, Rogol AD. A longitudinal assessment of hormonal and physical alterations during normal puberty in boys. V. Rising leptin levels may signal the onset of puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82**(4):1066-1070.
98. Mantzoros CS. Role of leptin in reproduction. *Ann N Y Acad Sci* 2000; **900**:174-183.
99. Messinis IE, Milingos SD. Leptin in human reproduction. *Hum Reprod Update* 1999; **5**(1):52-63.
100. Oates M, Woodside B, Walker CD. Chronic leptin administration in developing rats reduces stress responsiveness partly through changes in maternal behavior. *Horm Behav* 2000; **37**(4):366-376.
101. Proulx K, Clavel S, Nault G, Richard D, Walker CD. High neonatal leptin exposure enhances brain GR expression and feedback efficacy on the adrenocortical axis of developing rats. *Endocrinology* 2001; **142**(11):4607-4616.
102. Walker CD, Salzman C, Long H, Otis M, Roberge C, Gallo-Payet N. Direct inhibitory effects of leptin on the neonatal adrenal and potential consequences for brain glucocorticoid feedback. *Endocr Res* 2004; **30**(4):837-844.
103. Fu L, Patel MS, Bradley A, Wagner EF, Karsenty G. The molecular clock mediates leptin-regulated bone formation. *Cell* 2005; **122**(5):803-815.
104. Bennett BD, Solar GP, Yuan JQ, Mathias J, Thomas GR, Matthews W. A role for leptin and its cognate receptor in hematopoiesis. *Curr Biol* 1996; **6**(9):1170-1180.
105. Mantzoros CS, Moschos SJ. Leptin: in search of role(s) in human physiology and pathophysiology. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998; **49**(5):551-567.
106. Mikhail AA, Beck EX, Shafer A, Barut B, Gbur JS, Zupancic TJ, et al. Leptin stimulates fetal and adult erythroid and myeloid development. *Blood* 1997; **89**(5):1507-1512.

107. Godlewski MM, Slupecka M, Wolinski J, Skrzypek T, Skrzypek H, Motyl T, et al. Into the unknown - the death pathways in the neonatal gut epithelium. *J Physiol Pharmacol* 2005; **56 Suppl 3**:7-24.
108. Henson MC, Swan KF, Edwards DE, Hoyle GW, Purcell J, Castracane VD. Leptin receptor expression in fetal lung increases in late gestation in the baboon: a model for human pregnancy. *Reproduction* 2004; **127**(1):87-94.
109. Torday JS, Sun H, Wang L, Torres E, Sunday ME, Rubin LP. Leptin mediates the parathyroid hormone-related protein paracrine stimulation of fetal lung maturation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; **282**(3):L405-L410.
110. Garcia SI, Landa MS, Porto PI, Alvarez AL, Schuman M, Finkielman S, et al. Thyrotropin-releasing hormone decreases leptin and mediates the leptin-induced pressor effect. *Hypertension* 2002; **39**(2 Pt 2):491-495.
111. Shirasaka T, Takasaki M, Kannan H. Cardiovascular effects of leptin and orexins. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; **284**(3):R639-R651.
112. Matsuda J, Yokota I, Iida M, Murakami T, Naito E, Ito M, et al. Serum leptin concentration in cord blood: relationship to birth weight and gender. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82**(5):1642-1644.
113. Petridou E, Mantzoros CS, Belechri M, Skalkidou A, Dessypris N, Papatoma E, et al. Neonatal leptin levels are strongly associated with female gender, birth length, IGF-I levels and formula feeding. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005; **62**(3):366-371.
114. Saad MF, Damani S, Gingerich RL, Riad-Gabriel MG, Khan A, Boyadjian R, et al. Sexual dimorphism in plasma leptin concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82**(2):579-584.
115. Tsai PJ, Yu CH, Hsu SP, Lee YH, Chiou CH, Hsu YW, et al. Cord plasma concentrations of adiponectin and leptin in healthy term neonates: positive correlation with birthweight and neonatal adiposity. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004; **61**(1):88-93.
116. Vatten LJ, Nilsen ST, Odegard RA, Romundstad PR, Austgulen R. Insulin-like growth factor I and leptin in umbilical cord plasma and infant birth size at term. *Pediatrics* 2002; **109**(6):1131-1135.

117. Watanobe H, Habu S. Manipulation of neonatal gonadal steroid milieu and leptin secretion in later life in male and female rats. *Regul Pept* 2003; **110**(3):219-224.
118. Yang SW, Kim SY. The relationship of the levels of leptin, insulin-like growth factor-I and insulin in cord blood with birth size, ponderal index, and gender difference. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000; **13**(3):289-296.
119. Yeung LP, Wong AC, Wang X, Birmingham CL, Lewicka S, Chanoine JP. Different relationship between anthropometric markers and umbilical cord plasma leptin in Asian and Caucasian neonates. *Pediatr Res* 2003; **53**(6):1019-1024.
120. Cetin I, Morpurgo PS, Radaelli T, Taricco E, Cortelazzi D, Bellotti M, et al. Fetal plasma leptin concentrations: relationship with different intrauterine growth patterns from 19 weeks to term. *Pediatr Res* 2000; **48**(5):646-651.
121. Jaquet D, Leger J, Levy-Marchal C, Oury JF, Czernichow P. Ontogeny of leptin in human fetuses and newborns: effect of intrauterine growth retardation on serum leptin concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; **83**(4):1243-1246.
122. Pighetti M, Tommaselli GA, D'Elia A, Di CC, Mariano A, Di CA, et al. Maternal serum and umbilical cord blood leptin concentrations with fetal growth restriction. *Obstet Gynecol* 2003; **102**(3):535-543.
123. Yildiz L, Avci B, Ingec M. Umbilical cord and maternal blood leptin concentrations in intrauterine growth retardation. *Clin Chem Lab Med* 2002; **40**(11):1114-1117.
124. Gemma C, Sookoian S, Alvarinas J, Garcia SI, Quintana L, Kanevsky D, et al. Mitochondrial DNA depletion in small- and large-for-gestational-age newborns. *Obesity (Silver Spring)* 2006; **14**(12):2193-2199.
125. Christou H, Connors JM, Ziotopoulou M, Hatzidakis V, Papathanassoglou E, Ringer SA, et al. Cord blood leptin and insulin-like growth factor levels are independent predictors of fetal growth. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; **86**(2):935-938.
126. Varvarigou A, Mantzoros CS, Beratis NG. Cord blood leptin concentrations in relation to intrauterine growth. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1999; **50**(2):177-183.

127. Wiznitzer A, Furman B, Zuili I, Shany S, Reece EA, Mazor M. Cord leptin level and fetal macrosomia. *Obstet Gynecol* 2000; **96**(5 Pt 1):707-713.
128. Wolf HJ, Ebenbichler CF, Huter O, Bodner J, Lechleitner M, Foger B, et al. Fetal leptin and insulin levels only correlate in large-for-gestational age infants. *Eur J Endocrinol* 2000; **142**(6):623-629.
129. Rump P, Popp-Snijders C, Heine RJ, Hornstra G. Components of the insulin resistance syndrome in seven-year-old children: relations with birth weight and the polyunsaturated fatty acid content of umbilical cord plasma phospholipids. *Diabetologia* 2002; **45**(3):349-355.
130. Barker DJ. The developmental origins of chronic adult disease. *Acta Paediatr Suppl* 2004; **93**(446):26-33.
131. Dunger DB, Ong KK. Endocrine and metabolic consequences of intrauterine growth retardation. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2005; **34**(3):597-615.
132. Holt RI, Byrne CD. Intrauterine growth, the vascular system, and the metabolic syndrome. *Semin Vasc Med* 2002; **2**(1):33-43.
133. Hollenberg AN, Monden T, Flynn TR, Boers ME, Cohen O, Wondisford FE. The human thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone through two distinct classes of negative thyroid hormone response elements. *Mol Endocrinol* 1995; **9**(5):540-550.
134. Satoh T, Yamada M, Iwasaki T, Mori M. Negative regulation of the gene for the preprothyrotropin-releasing hormone from the mouse by thyroid hormone requires additional factors in conjunction with thyroid hormone receptors. *J Biol Chem* 1996; **271**(44):27919-27926.
135. Lechan RM, Wu P, Jackson IM. Immunolocalization of the thyrotropin-releasing hormone prohormone in the rat central nervous system. *Endocrinology* 1986; **119**(3):1210-1216.
136. Pirola CJ, Balda MS, Finkielman S, Nahmod VE. Thyrotropin-releasing hormone increases the number of muscarinic receptors in the lateral septal area of the rat brain. *Brain Res* 1983; **273**(2):387-391.

137. Nurminen ML, Paakkari I, Seppala T. Serotonergic involvement in the cardiovascular stimulation by thyrotropin-releasing hormone (TRH) in anesthetized rats. *Neurosci Lett* 1991; **127**(2):147-149.
138. Okuda C, Mizobe T, Miyazaki M. The involvement of central cholinergic mechanisms in cardiovascular responses to intracerebroventricular and intravenous administration of thyrotropin-releasing hormone. *Life Sci* 1987; **40**(13):1293-1299.
139. Siren AL, Vonhof S, Feuerstein G. Hemodynamic defense response to thyrotropin-releasing hormone injected into medial preoptic nucleus in rats. *Am J Physiol* 1991; **261**(2 Pt 2):R305-R312.
140. Hokfelt T, Tsuruo Y, Ulfhake B, Cullheim S, Arvidsson U, Foster GA, et al. Distribution of TRH-like immunoreactivity with special reference to coexistence with other neuroactive compounds. *Ann N Y Acad Sci* 1989; **553**:76-105.
141. Yanagisawa T, Prasad C, Peterkofsky A. The subcellular and organ distribution and natural form of histidyl-proline diketopiperazine in rat brain determined by a specific radioimmunoassay. *J Biol Chem* 1980; **255**(21):10290-10294.
142. Garcia SI, Dabsys SM, Martinez VN, Delorenzi A, Santajuliana D, Nahmod VE, et al. Thyrotropin-releasing hormone hyperactivity in the preoptic area of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1995; **26**(6 Pt 2):1105-1110.
143. Fekete C, Kelly J, Mihaly E, Sarkar S, Rand WM, Legradi G, et al. Neuropeptide Y has a central inhibitory action on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Endocrinology* 2001; **142**(6):2606-2613.
144. Sarkar S, Legradi G, Lechan RM. Intracerebroventricular administration of alpha-melanocyte stimulating hormone increases phosphorylation of CREB in TRH- and CRH-producing neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res* 2002; **945**(1):50-59.
145. Bjorbaek C, Elmquist JK, Frantz JD, Shoelson SE, Flier JS. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol Cell* 1998; **1**(4):619-625.

146. Harris M, Aschkenasi C, Elias CF, Chandrankunnel A, Nillni EA, Bjorbaek C, et al. Transcriptional regulation of the thyrotropin-releasing hormone gene by leptin and melanocortin signaling. *J Clin Invest* 2001; **107**(1):111-120.
147. Fekete C, Legradi G, Mihaly E, Huang QH, Tatro JB, Rand WM, et al. alpha-Melanocyte-stimulating hormone is contained in nerve terminals innervating thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone gene expression. *J Neurosci* 2000; **20**(4):1550-1558.
148. Nillni EA, Vaslet C, Harris M, Hollenberg A, Bjorbak C, Flier JS. Leptin regulates prothyrotropin-releasing hormone biosynthesis. Evidence for direct and indirect pathways. *J Biol Chem* 2000; **275**(46):36124-36133.
149. Landa MS, Garcia SI, Schuman ML, Alvarez AL, Finkielman S, Pirola CJ. Thyrotropin-Releasing Hormone Precursor Gene Knocking Down Impedes Melanocortin-Induced Hypertension in Rats. *Hypertension* 2008.
150. Cockle SM, Aitken A, Beg F, Smyth DG. A novel peptide, pyroglutamylglutamylproline amide, in the rabbit prostate complex, structurally related to thyrotrophin-releasing hormone. *J Biol Chem* 1989; **264**(14):7788-7791.
151. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; **193**(1):265-275.
152. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; **162**(1):156-159.
153. Singer-Sam J, Grant M, LeBon JM, Okuyama K, Chapman V, Monk M, et al. Use of a HpaII-polymerase chain reaction assay to study DNA methylation in the Pcg-1 CpG island of mouse embryos at the time of X-chromosome inactivation. *Mol Cell Biol* 1990; **10**(9):4987-4989.
154. Singer-Sam J, Robinson MO, Bellve AR, Simon MI, Riggs AD. Measurement by quantitative PCR of changes in HPRT, PGK-1, PGK-2, APRT, MTase, and Zfy gene transcripts during mouse spermatogenesis. *Nucleic Acids Res* 1990; **18**(5):1255-1259.

155. Singer-Sam J, LeBon JM, Tanguay RL, Riggs AD. A quantitative HpaII-PCR assay to measure methylation of DNA from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 1990; **18**(3):687.
156. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999; **94**(9):2467-2474.
157. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; **28**(7):412-419.
158. Landa MS, Garcia SI, Schuman ML, Burgueno A, Alvarez AL, Saravia FE, et al. Knocking down the diencephalic thyrotropin-releasing hormone precursor gene normalizes obesity-induced hypertension in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; **292**(5):E1388-E1394.
159. Langley-Evans SC, Clamp AG, Grimble RF, Jackson AA. Influence of dietary fats upon systolic blood pressure in the rat. *Int J Food Sci Nutr* 1996; **47**(5):417-425.
160. Langley-Evans SC, Welham SJ, Sherman RC, Jackson AA. Weanling rats exposed to maternal low-protein diets during discrete periods of gestation exhibit differing severity of hypertension. *Clin Sci (Lond)* 1996; **91**(5):607-615.
161. Langley SC, Jackson AA. Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Clin Sci (Lond)* 1994; **86**(2):217-222.
162. Schreuder MF, van Wijk JA, Delemarre-van de Waal HA. Intrauterine growth restriction increases blood pressure and central pulse pressure measured with telemetry in aging rats. *J Hypertens* 2006; **24**(7):1337-1343.
163. Garcia SI, Porto PI, Alvarez AL, Martinez VN, Shaurli D, Finkielman S, et al. Central overexpression of the TRH precursor gene induces hypertension in rats: antisense reversal. *Hypertension* 1997; **30**(3 Pt 2):759-766.
164. Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart LA, Scholmerich J, et al. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and

- molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol* 2006; **36**(3):485-501.
165. He Y, Zhang H, Fu F. The effects of swimming exercise on high-fat-diet-induced steatohepatitis. *J Sports Med Phys Fitness* 2008; **48**(2):259-265.
166. Galler JR, Tonkiss J. Prenatal protein malnutrition and maternal behavior in Sprague-Dawley rats. *J Nutr* 1991; **121**(5):762-769.
167. Holemans K, Gerber R, Meurrens K, De CF, Poston L, Van Assche FA. Maternal food restriction in the second half of pregnancy affects vascular function but not blood pressure of rat female offspring. *Br J Nutr* 1999; **81**(1):73-79.
168. Vickers MH, Ikenasio BA, Breier BH. IGF-I treatment reduces hyperphagia, obesity, and hypertension in metabolic disorders induced by fetal programming. *Endocrinology* 2001; **142**(9):3964-3973.
169. Woods LL, Ingelfinger JR, Nyengaard JR, Rasch R. Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. *Pediatr Res* 2001; **49**(4):460-467.
170. Franco MC, Arruda RM, Fortes ZB, de Oliveira SF, Carvalho MH, Tostes RC, et al. Severe nutritional restriction in pregnant rats aggravates hypertension, altered vascular reactivity, and renal development in spontaneously hypertensive rats offspring. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002; **39**(3):369-377.
171. Siemelink M, Verhoef A, Dormans JA, Span PN, Piersma AH. Dietary fatty acid composition during pregnancy and lactation in the rat programs growth and glucose metabolism in the offspring. *Diabetologia* 2002; **45**(10):1397-1403.
172. Shepherd PR, Crowther NJ, Desai M, Hales CN, Ozanne SE. Altered adipocyte properties in the offspring of protein malnourished rats. *Br J Nutr* 1997; **78**(1):121-129.
173. Krechowec SO, Vickers M, Gertler A, Breier BH. Prenatal influences on leptin sensitivity and susceptibility to diet-induced obesity. *J Endocrinol* 2006; **189**(2):355-363.

174. Vickers MH, Gluckman PD, Coveny AH, Hofman PL, Cutfield WS, Gertler A, et al. Neonatal leptin treatment reverses developmental programming. *Endocrinology* 2005; **146**(10):4211-4216.
175. Vickers MH, Gluckman PD, Coveny AH, Hofman PL, Cutfield WS, Gertler A, et al. The effect of neonatal leptin treatment on postnatal weight gain in male rats is dependent on maternal nutritional status during pregnancy. *Endocrinology* 2008; **149**(4):1906-1913.
176. Ahima RS, Prabakaran D, Flier JS. Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *J Clin Invest* 1998; **101**(5):1020-1027.
177. Ahima RS, Saper CB, Flier JS, Elmquist JK. Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 2000; **21**(3):263-307.
178. Ahima RS, Hileman SM. Postnatal regulation of hypothalamic neuropeptide expression by leptin: implications for energy balance and body weight regulation. *Regul Pept* 2000; **92**(1-3):1-7.
179. Pinto S, Roseberry AG, Liu H, Diano S, Shanabrough M, Cai X, et al. Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science* 2004; **304**(5667):110-115.
180. Dahri S, Snoeck A, Reusens-Billen B, Remacle C, Hoet JJ. Islet function in offspring of mothers on low-protein diet during gestation. *Diabetes* 1991; **40** Suppl 2:115-120.
181. Langley SC, Browne RF, Jackson AA. Altered glucose tolerance in rats exposed to maternal low protein diets in utero. *Comp Biochem Physiol Physiol* 1994; **109**(2):223-229.
182. Petry CJ, Dorling MW, Pawlak D.B., Ozanne SE, Hales CN. Diabetes in old male offspring of rat dams fed a reduced protein diet. *Int J Exp Diabetes Res* 2[2], 139-143. 2001.
183. Garofano A, Czernichow P, Breant B. In utero undernutrition impairs rat beta-cell development. *Diabetologia* 1997; **40**(10):1231-1234.

184. Lewis RM, Forhead AJ, Petry CJ, Ozanne SE, Hales CN. Long-term programming of blood pressure by maternal dietary iron restriction in the rat. *Br J Nutr* 2002; **88**(3):283-290.
185. Schreuder MF, Nyengaard JR, Remmers F, van Wijk JA, Delemarre-van de Waal HA. Postnatal food restriction in the rat as a model for a low nephron endowment. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; **291**(5):F1104-F1107.
186. Denton KM. Can adult cardiovascular disease be programmed in utero?. *J Hypertens* 2006; **24**(7):1245-1247.
187. Perello M, Friedman T, Paez-Espinosa V, Shen X, Stuart RC, Nillni EA. Thyroid hormones selectively regulate the posttranslational processing of prothyrotropin-releasing hormone in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Endocrinology* 2006; **147**(6):2705-2716.
188. Segerson TP, Kauer J, Wolfe HC, Mobtaker H, Wu P, Jackson IM, et al. Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Science* 1987; **238**(4823):78-80.
189. Maia AL, Kim BW, Huang SA, Harney JW, Larsen PR. Type 2 iodothyronine deiodinase is the major source of plasma T3 in euthyroid humans. *J Clin Invest* 2005; **115**(9):2524-2533.
190. Setia S, Sridhar MG, Bhat V, Chaturvedula L, Vinayagamoorti R, John M. Insulin sensitivity and insulin secretion at birth in intrauterine growth retarded infants. *Pathology* 2006; **38**(3):236-238.
191. Quax PH, van den Hoogen CM, Verheijen JH, Padro T, Zeheb R, Gelehrter TD, et al. Endotoxin induction of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 mRNA in rat tissues in vivo. *J Biol Chem* 1990; **265**(26):15560-15563.
192. Sawdey MS, Loskutoff DJ. Regulation of murine type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in vivo. Tissue specificity and induction by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta. *J Clin Invest* 1991; **88**(4):1346-1353.
193. Kudo T, Nakayama E, Suzuki S, Akiyama M, Shibata S. Cholesterol diet enhances daily rhythm of Pai-1 mRNA in the mouse liver. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; **287**(4):E644-E651.

194. Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; **106**(4):473-481.
195. Ota T, Takamura T, Kurita S, Matsuzawa N, Kita Y, Uno M, et al. Insulin resistance accelerates a dietary rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2007; **132**(1):282-293.
196. Bueno MR, Daneri A, Armendariz-Borunda J. Cholestasis-induced fibrosis is reduced by interferon alpha-2a and is associated with elevated liver metalloprotease activity. *J Hepatol* 2000; **33**(6):915-925.
197. Zhang LP, Takahara T, Yata Y, Furui K, Jin B, Kawada N, et al. Increased expression of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor during liver fibrogenesis of rats: role of stellate cells. *J Hepatol* 1999; **31**(4):703-711.
198. Comuzzie AG, Funahashi T, Sonnenberg G, Martin LJ, Jacob HJ, Black AE, et al. The genetic basis of plasma variation in adiponectin, a global endophenotype for obesity and the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; **86**(9):4321-4325.
199. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 2003; **423**(6941):762-769.
200. Bjursell M, Ahnmark A, Bohlooly Y, Williams-Olsson L, Rhedin M, Peng XR, et al. Opposing effects of adiponectin receptors 1 and 2 on energy metabolism. *Diabetes* 2007; **56**(3):583-593.
201. Messier N, Laflamme L, Hamann G, Langlois MF. In vitro effect of Triac on resistance to thyroid hormone receptor mutants: potential basis for therapy. *Mol Cell Endocrinol* 2001; **174**(1-2):59-69.
202. Ayala JE, Bracy DP, Hansotia T, Flock G, Seino Y, Wasserman DH, et al. Insulin action in the double incretin receptor knockout mouse. *Diabetes* 2008; **57**(2):288-297.
203. Wildhage I, Trusheim H, Goke B, Lankat-Buttgereit B. Gene expression of the human glucagon-like peptide-1 receptor is regulated by Sp1 and Sp3. *Endocrinology* 1999; **140**(2):624-631.

204. During MJ, Cao L, Zuzga DS, Francis JS, Fitzsimons HL, Jiao X, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor is involved in learning and neuroprotection. *Nat Med* 2003; **9**(9):1173-1179.
205. Scrocchi LA, Brown TJ, MaClusky N, Brubaker PL, Auerbach AB, Joyner AL, et al. Glucose intolerance but normal satiety in mice with a null mutation in the glucagon-like peptide 1 receptor gene. *Nat Med* 1996; **2**(11):1254-1258.
206. Wang ND, Finegold MJ, Bradley A, Ou CN, Abdelsayed SV, Wilde MD, et al. Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science* 1995; **269**(5227):1108-1112.
207. Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, et al. C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev* 2002; **16**(1):22-26.